

ENZYMATISCHE STUDIEN ZUR BIOSYNTHESE DER N-ACETYL-
7(8)-O-ACETYLNEURAMINSÄURE IN RINDERSUBMAXILLARIS-
DRÜSEN

DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES GRADES EINES
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
DER
ABTEILUNG FÜR CHEMIE
AN DER RUHR-UNIVERSITÄT BOCHUM

von
Clarice Ferreira do Amaral
São Paulo/ Brasilien

Bochum 1972

ENZYMATISCHE STUDIEN ZUR BIOSYNTHESE DER N-ACETYL-
7(8)-O-ACETYLNEURAMINSÄURE IN RINDERSUBMAXILLARIS-
DRÜSEN

DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES GRADES EINES
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
DER
ABTEILUNG FÜR CHEMIE
AN DER RUHR-UNIVERSITÄT BOCHUM

von

Clarice Ferreira do Amaral
São Paulo / Brasilien

Bochum 1972



Dissertation eingereicht am: 14.11.1972

Tag der mündlichen Prüfung 15.12.1972

Referent: Prof. Dr. H. Faillard und Doz. Dr. R. Schauer

Korreferent: Prof. Dr. G. Pfeleiderer

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
THEORETISCHER TEIL	
1. Entdeckung und Strukturaufklärung der Acylneuraminsäuren.....	2
2. Das Vorkommen und die Eigenschaften verschiedener Acylneuraminsäuren.....	5
3. Biosynthese der Acylneuraminsäuren...	9
4. Acylneuraminsäuren: Bestandteile von Glykoproteinen und Ganglio- siden.....	15
5. Einfluß von Acylneuraminsäuren auf die Funktionen von Glykoproteinen und Gangliosiden.....	20
6. Problemstellung.....	24
EXPERIMENTELLER TEIL	
1. Substanzen	
a. bezogene Substanzen.....	28
b. isolierte bzw. synthetisierte Substanzen	
I. Isolierung der N-Acetyl- und N- Acetyl-7(3)-O-acetylneuramin- säure aus den Rindersubmaxil- larisdrüsen.....	28
II. Herstellung des Neuraminsäure- β -methylglykosids (Methoxyneu- raminsäure).....	30

III.	Synthese der N- $[1-^{14}\text{C}]$ - Acetylneuraminsäure.....	30
IV.	Synthese der CMP-N- $[1-^{14}\text{C}]$ - Acetylneuraminsäure.....	31

2. Enzyme

a.	Anreicherung der CMP-N-Acetyl- neuraminat-Synthase.....	34
b.	Versuche zur Präparation der Acetyl-CoA:N-Acetylneuraminat- 7-oder-8-O-acetyltransferase	
	I. membrangebundenes Enzym.....	35
	II. gelöstes Enzym.....	37

3. Analysenmethoden

a.	Bestimmung der N-Acetyl-, N- Glykoly-, N-Acetyl-7(8)-O- acetylneuraminsäure und ihrer ent- sprechenden CMP-Verbindungen	
	I. Orcinol- Fe^{3+} -Test oder Bialtest.	38
	II. Perjodsäure/Thiobarbitursäure- Test (TBA-Test).....	39
b.	Dünnschichtchromatographie.....	40
c.	Bestimmung von O-Acetylgruppen nach Hestrin.....	40
d.	Umwandlung der O-Acetylgruppen der N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure in Acetylhydroxamat.....	41
e.	Umwandlung der N-Acetyl-O-acetyl- neuraminsäure in N-Acetylneuramin- säure.....	41
f.	Proteinbestimmung.....	42
g.	Radioaktivitätsmessung.....	42
h.	Bestimmung von AcCoA.....	42
i.	Acetyl-CoA:N-Acetylneuraminat-7- oder -8-O-acetyltransferase-Test	

I. Reaktion des Enzyms mit dem endogenen Substrat.....	42
II. Reaktion des Enzyms mit löslichen Substraten:N-Acetyl- und N-Glykolylnneuraminsäure sowie CMP-N-Acetylneuraminsäure.....	45
j. CMP-N-Acetylneuraminat-Synthase-Test.....	45

4. Ergebnisse

a. Eigenschaften der Acetyl-CoA:N-Acetylneuraminat-7-oder 8-O-acetyltransferase	
I. Abhängigkeit der Umsetzungsgeschwindigkeit vom pH-Wert.....	48
II. Der zeitliche Verlauf der Enzymreaktion	49
III. Abhängigkeit von der AcCoA-Konzentration.....	50
IV. Ermittlung der Michealis-Konstante für AcCoA.....	51
V. Hemmung durch CoA.....	53
VI. Substratspezifität.....	56
b. Untersuchungen über die CMP-N-Acetylneuraminat Synthase	
I. Beständigkeit der N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure unter den Inkubationsbedingungen.....	58
II. Reaktion verschiedener N-Acylneuraminsäuren mit CTP	59
III. Kinetik der CMP-N-Acetylneuraminat-Synthase bei der Reaktion mit N-Acetyl- und mit N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure	
α. Der zeitliche Verlauf der Enzymreaktion.....	63
β. Bestimmung der Michaelis-Konstanten in Bezug auf N-Acetyl- bzw. N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure.....	63

DISKUSSION	66
ZUSAMMENFASSUNG	72
LITERATURVERZEICHNIS	74

ABKÜRZUNGEN

NeuNAc	-	N-Acetylneuraminsäure
NeuNAcOAc	-	N-Acetyl-7-bzw. 8-O-Acetylneuraminsäure
NeuNGl	-	N-Glykolylnuraminsäure
AcCoA	-	Acetyl-Coenzym A
CoA	-	Coenzym A
CMP	-	Cytidin -5'- Monophosphat
CTP	-	Cytidin -5'- Triphosphat
ATP	-	Adenosin-5'- Triphosphat
UTP	-	Uridin-5'-Triphosphat
GTP	-	Guanosin-5'-Triphosphat
EDTA	-	Äthylendiamintetraessigsäure
NAcMan	-	N-Acetylmannosamin
PEP	-	Phosphoenolpyruvat
Gal	-	Galactose
GalNAc	-	N-Acetylgalactosamin
Glc	-	Glucose
NAD	-	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	-	red. NAD
CS	-	Citrat Synthase (Citrate Oxalacetate Lyase, CoA acetylating E.C.4.1.3.7)
MDH	-	Malatdehydrogenase (L-Malate:NAD Oxidoreductase E.C. 1.1.1.37)
TCA	-	Trichloressigsäure
PTA	-	Phosphorwolframsäure

EINLEITUNG

Die Acylneuraminsäuren, ein Sammelname für verschiedene N- und O-Acylderivate der Neuraminsäure, sind als charakteristische Bestandteile hauptsächlich von Glykoproteinen und Glykolipiden im Tierreich weit verbreitet.

Sie sind von großer biologischer Bedeutung insofern, als sie die physikalischen, chemischen und besonders auch biologischen Eigenschaften der jeweiligen Verbindungen beeinflussen. Den biologischen Funktionen wird ein eigenes Kapitel gewidmet (Kap. 5)

Der Grundmechanismus der Biosynthese des N-Acetylneuraminsäure-Skeletts war zwar bekannt, aber die Biosynthese der Acylneuraminsäuren mit verschiedenartigen Acylsubstituenten und mit den daran beteiligten Enzymen war noch zu wenig untersucht worden. Das Hauptziel dieser Arbeit ist die Biosynthese der O-acetylierten N-Acetylneuraminsäuren, speziell die Untersuchung der Enzyme, die am Einbau von O-Acetylgruppen in die N-Acetylneuraminsäure beteiligt sind. Die Aufklärung der Biosynthese der O-Acetylneuraminsäuren ist deshalb besonders lohnend, da durch Einführung dieser neuen Acetylgruppen das Molekül schlechter durch Neuraminidase aus glykosidischen Bindungen gelöst werden kann und damit mehr oder weniger dem katabolen Stoffwechsel entzogen ist.

THEORETISCHER TEIL

1. ENTDECKUNG UND STRUKTURAUFKLÄRUNG DER ACYLNEURAMINSÄUREN

Die ersten Vertreter der Acylneuraminsäuren wurden von Blix ¹ 1936 aus Rindersubmaxillarisdrüsen isoliert. Er nannte die damals noch unbekannten Substanzen "Sialinsäuren", ein Sammelname für die Acylneuraminsäuren, der auf ihre Herkunft aus Speichel hinweist. 1941 isolierte Klenk ² durch Methanolyse von Gangliosiden des Gehirns und 1951 Gottschalk ³ durch Einwirkung von Influenzaviren auf Ovomucin und Harnmucin Substanzen, die ähnliche Eigenschaften wie die Sialinsäuren von Blix zeigten. Klenk nannte sie, ihrer Herkunft wegen, "Neuraminsäure". Sie stellt jedoch nicht freie Neuraminsäure dar, sondern Neuraminsäure- β -methylglykosid (Abb. 3).

Klenk und Faillard ⁴ (1954) und auch Klenk, Faillard und Lempfrid ⁵ gelang die Isolierung des wichtigsten in der Natur vorkommenden Derivates der Neuraminsäure, der N-Acetylneuraminsäure (Abb. 1) in kristalliner Form sowohl aus Rindersubmaxillarisdrüsen durch Säurehydrolyse als auch aus Harnmucin nach Einwirkung von Influenza Viren.

Kurz danach wurden andere Derivate der Neuraminsäure isoliert: die N-Glykolylnneuraminsäure von Blix und auch von Klenk und Uhlenbruck ⁷ aus Schweinesubmaxillarisdrüsenmucin und die Di- und Triacetylneuraminsäuren von Blix (6,8) aus Rindersubmaxillarisdrüsenmucin (N-Acetyl-7-O-acetylneuraminsäure und N-Acetyl-7,8-O-di-acetylneuraminsäure) und aus Pferdesubmaxillarisdrüsenmucin (N-Acetyl-4-O-acetylneuraminsäure).

Über weitere zum Teil seltener aufgefundene Acylneuraminsäure-Derivate wird im Kapitel 2 berichtet.

Im Gegensatz zur Aufdeckung der funktionellen Gruppen der N-Acetylneuraminsäuren - eine reduzierende Gruppe, eine Carboxyl-, eine N-Acetyl- und fünf Hydroxylgruppen - nahm die Feststellung der richtigen molekularen Zusammensetzung viel mehr Zeit in Anspruch.

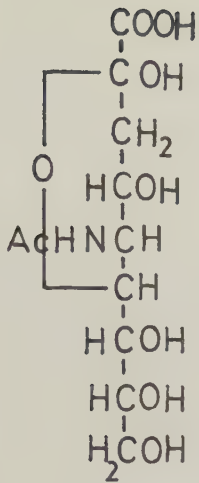
Das erste Licht über die Strukturformel der N-Acetylneuraminsäure brachten die Synthesen von Gottschalk⁹ 1955 aus N-Acetylglucosamin und Brenztraubensäure und die von Cornforth (10,11) et al. 1957 aus N-Acetylglucosamin und Oxalessigsäure. Aufgrund dieser Synthesen glaubte man, daß die N-Acetylneuraminsäure ein Kondensationsprodukt aus Pyruvat und N-Acetylmannosamin sei.

Überraschenderweise konnten Comb und Roseman¹² durch Einwirkung einer Aldolase aus dem Bakterium *Cl. perfringens* die N-Acetylneuraminsäure in Pyruvat und N-Acetylmannosamin in einer reversiblen Reaktion aufspalten. Die N-Acetylneuraminsäure wurde dann als ein Derivat des N-Acetylmannosamins dargestellt, und damit war die Konfiguration von C₅ bis C₈ festgelegt (Abb. 1). Die Herstellung der N-Acetylneuraminsäure von Gottschalk und Cornforth aus N-Acetylglucosamin fand ihre Erklärung im alkalischen Reaktionsmilieu, in dem N-Acetylglucosamin zu N-Acetylmannosamin epimerisiert wird.

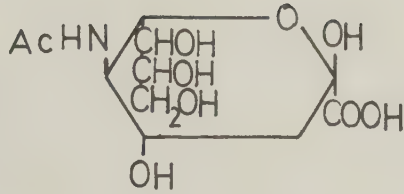
Die Konfiguration am C₄ wurde durch Arbeiten von Kuhn und Mitarbeitern (13,14) aufgeklärt.

Aufgrund aller dieser Untersuchungen kann der N-Acetylneuraminsäure folgender systematischer Name zugeordnet werden: β -D(-)-5-Acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galaktononulosaminsäure (15). (β -D- bezieht sich auf die Konfiguration des letzten asymmetrischen C-Atoms der 9-C-Kette).

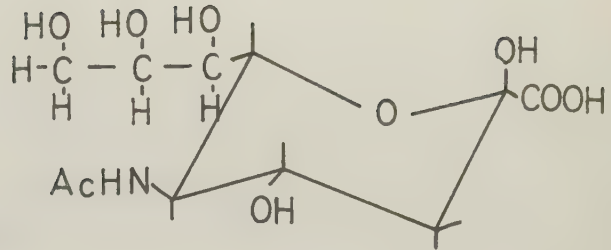
In den letzten Jahren konnten Lutz et al. (16) die absolute Konformation der N-Acetylneuraminsäure anhand NMR-spektroskopischer Untersuchungen feststellen: eine ¹-C Konformation nach Reeves (Abb. 1), wobei alle großen Substituenten äquatorial stehen.



nach Fischer



nach Haworth



nach Reeves

Abb. 1: Struktur der N-Acetylneuraminsäure

Die N-Acetylneuraminsäure sowie alle anderen in der Natur vorkommenden Acylneuraminsäuren (s. Kap. 2) sind N- und manchmal zusätzlich O-Acylderivate der eigentlichen Neuraminsäure, die folgende Struktur hat.

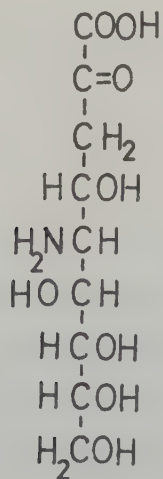


Abb. 2: Struktur der Neuraminsäure

Diese Polyhydroxyaminosäure mit reduzierenden Eigenschaften ist nicht beständig; sie wird sofort durch die Bildung einer Schiff'schen Base cyclisiert, wobei in mehreren Schritten rote Pyrrolderivate ("Chromogene") und durch weitere Umwandlungen braune Huminsäuren entstehen (17). Diese Reaktion wird durch Acylierung der Aminogruppe oder durch eine glykosidische Bindung der Neuraminsäure verhindert. Ein stabiles leicht kristallisierbares Derivat der Neuraminsäure ist ihr Methylglykosid (Methoxyneuraminsäure):

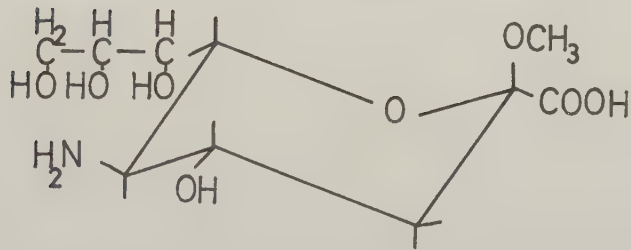


Abb. 3: Struktur des Neuraminsäure- β -Methylglykosids

2. DAS VORKOMMEN UND DIE EIGENSCHAFTEN VERSCHIEDENER ACYLNEURAMINSÄUREN

a. VORKOMMEN

Eine Reihe verschiedener N- und O-acylierter Neuraminsäuren ist bekannt. N-Acylsubstituenten der Neuraminsäure sind Acetyl-oder Glykolylgruppen. Die Hydroxylgruppen können auch O-acetyliert und methyliert sein; dagegen gibt es über das Vorkommen von O-Glykolylderivaten keinen Hinweis (18). Die Tabelle 1 faßt die in der Natur vorkommenden Acylneuraminsäuren zusammen.

TABELLE 1:

Vorkommen verschiedener Acylneuraminsäuren. x,y und z bedeuten unbekannte Positionen der O-Acetylgruppen

Acylneuraminsäuren	Isoliert aus	Lit.Stelle
N-Acetyl-neuraminsäure	Rindersubmax.drüsen	4
N-Acetyl-4-O-acetylneuraminsäure	Pferdesubmax.drüsen	6,19
N-Acetyl-7-O-acetylneuraminsäure	Rindersubmax.drüsen	6,19
N-Acetyl-8-O-acetylneuraminsäure	Rindersubmax.drüsen	8,20
N-Acetyl-7,8-di-O-acetylneuraminsäure	Rindersubmax.drüsen	8
N-Acetyl-4,x-di-O-acetylneuraminsäure	Pferdesubmax.drüsen	20
N-Acetyl-x,y,z-tri-O-acetylneuraminsäure	Rindersubmax.drüsen	21
N-Glykolylnneuraminsäure	Schweinesubmax.drüsen	6,19
N-Glykolyl-4(?)-O-acetylneuraminsäure	Pferderythrozytenmembr.	22
N-Glykolyl-8-O-methylneuraminsäure	Seestern Asterias forbesi	23
N-(O-Acetyl-glykolyl)-4-methyl-4,9-dideoxineuraminsäure	Eihülle des Seeigels	24

Acylneuraminsäuren wurden nur in tierischem Material und einigen Bakterien aber nie in Pflanzen (25) gefunden. Das verbreitetste Derivat ist die N-Acetylneuraminsäure. Sie kommt als Polymer (Colominsäure) im Kulturfiltrat von E. Coli K-235 (26) vor. In tierischen Geweben ist meistens ein Gemisch verschiedener Acylneuraminsäuren nachweisbar. So findet man in vielen Glykoproteinen und Gangliosiden neben der N-Acetyl- auch die N-Glykolylnneuraminsäure.

Das Organ mit dem höchsten Anteil an N-Glykolylnneuraminsäure ist die Submaxillarisdrüse vom Schwein. Sie macht 90% der Acylneuraminsäuren dieses Gewebes aus.

N-Glykolylnneuraminsäure kommt noch in vielen anderen tierischen Materialien vor: Rindererythrozyten (27), Gangliosiden aus Pferdererythrozyten (28), Haut von Kälberfoten (29), Serumglykoproteinen (30), in Submaxillarisdrüsen von Rind und Pferd (20), in Gangliosiden aus dem Gehirn des Huhnes (31). Während N-Glykolylnneuraminsäure noch beim Menschenaffen vorkommt, hat man sie interessanterweise beim Menschen noch nie mit Sicherheit nachgewiesen.

O-Acetylierte N-Acetylneuraminsäuren sind im Submaxillaris mucin

vom Rind und Pferd in großen Mengen vorhanden (20). Über die Position der O-Acetylgruppen gibt Tabelle 1 Auskunft.

In kleineren Mengen sind O-Acetylneuraminsäuren sowohl in anderen Glykoproteinen von Tieren (32,33,34) und von Menschen (35,36) vertreten als auch in Oligosacchariden: N-Acetyl-O-acetylneuraminsäurelactose (Kuh- und Frauenmilch, Frauen-, Kuh-, Schaf-, Ziegen-, Schweinecolostrum (37)). Das 8-O-Acetyl-isomer wurde aus Gangliosiden des Gehirns von Knochenfischen isoliert (38). In der Natur gibt es auch O-acetylierte Derivate der Muraminsäure (6-O-Acetylmuraminsäure in *Staphylococcus aureus* (39,40) und anderer Kohlenhydratekomponenten der Bakterienzellwand (*Pneumococcus* Typ 34: 6-O-Acetyl-D-Galactose (41), *Diplococcus pneumoniae* Typ 34: 6-O-Acetyl-D-Galactose (42), *Klebsiella aerogenes* A₃ (S1) Typ 54: O-Acetylgruppe an Glucuronsäure (?) oder Fucose (?) gebunden (43), *Salmonella anatum*: O-Acetyl-Galactose (44,45), *Pneumococcus* Typ XVIII: O-Acetyl-galactose (46)).

b. EIGENSCHAFTEN

Die Acylneuraminsäuren kommen in der Natur immer α -glykosidisch gebunden vor. Sie können von den Glykoproteinen oder von den Gangliosiden durch mild-saure Hydrolyse unter schonenden Bedingungen (pH=1-2, 1 Std. 60-90°C) (4,6,47) oder durch Einwirkung von bakterieller, viraler und Säugetierneuraminidase abgespalten werden (48,50). 7-O-Acetyl- und 8-O-Acetyl-derivate werden von der Neuraminidase (Acylneuraminid-acyl-neuraminosyl hydrolase E.C. 3.2.1.18) langsamer angegriffen als die N-Acetyl- und N-Glykolylnneuraminsäure, während die 4-O-Acetylverbindung völlig Neuraminidase resistent ist (20).

Die Acylneuraminsäuren sind verhältnismäßig starke Säuren. Ihr pK-Wert liegt je nach Art der N- und O-Substituenten zwischen 1.8 und 2.6 (51,52)

Die Acylneuraminsäuren sind gut wasserlösliche Substanzen. Sie sind in Methanol schwer löslich (mit Ausnahme der O-acetylierten Derivate) und unlöslich in Petroläther. Sie werden aus Essigsäure-, Methanol-, Äthanol-, Dioxan-Wassergemischen kristallisiert.

Die Kristalle der Acylneuraminsäuren schmelzen, wobei sie sich unter Bildung einer brauen Farbe zersetzen. Die Tabelle 2 zeigt die Zersetzungstemperatur sowie die optische Drehung von Derivaten, die Kristallin erhalten wurden.

TABELLE 2:

Zersetzungspunkte und optische Drehung von verschiedenen Acylneuraminsäuren; die hochgesetzten Zahlen sind die betreffenden Literaturstellen

Acylneuraminsäuren	Zersetzungspunkt (°C)	Optische Drehung $[\alpha]_D^{20}$ (Grad.)
N-Acetylneuraminsäure	6,19,53 185-187	- 4,53,54 32
N-Acetyl-4-O-acetylneuraminsäure	199-200 ⁸	- 62 ⁸
N-Acetyl-7-O-acetylneuraminsäure	138-140 ⁸	+ 6 ⁸
N-Acetyl-7,8-di-O-acetylneuraminsäure	130-131 ⁸	+ 9 ⁸
N-Glykolylnneuraminsäure	185-187 ^{6,19}	- 32 ^{6,7,19}

Die Acylneuraminsäuren sind sehr labile Substanzen, Durch Einwirkung von Mineralsäuren zersetzen sie sich unter Bildung von roten bis dunkelbraunen Produkten (Chromogene und Huminsäuren). Die meisten der bisherigen Ergebnisse in der Erforschung des Acylneuraminsäure-Abbaus deuten stark darauf hin, daß es sich dabei im wesentlichen um die Entstehung von Pyrrolkörpern nach Abspaltung der N-Acylgruppen handelt (Chromogene) (17,27,55). Die Huminsäuren bilden sich, wenn Acylneuraminsäuren mit 1N HCl bei 100°C für längere Zeit behandelt werden. Sie sind Polymere der entstandenen Pyrrollderivate (17). Bei pH-Werten zwischen 4 und 5 haben die Acylneuraminsäuren in wässriger Lösung ihr Stabilitäts-Maximum (56). In mild alkalischem Milieu gibt die N-Acetylneuraminsäure zum Teil nach Abspaltung der N-Acetylgruppe Pyrrollderivate (56), zum Teil tritt eine Spaltung der Kette zwischen C₃ und C₄ auf, wobei Pyruvat und N-Acetylmannosamin entstehen (57,58). Verschiedenen Methoden der Acetylneuraminsäurebestimmung liegt die Bildung dieser Chromogene zugrunde. Die davon am häufigsten gebrauchte ist der Nachweis mit Orcinol/Fe³⁺ (Bialreaktion) (59), der in dieser Arbeit zur Bestimmung der

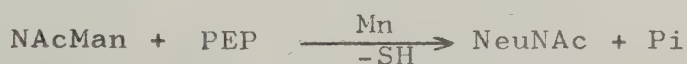
Acylneuraminsäuren oft benutzt wird und im experimentellen Teil beschrieben ist.

3. BIOSYNTHESE DER ACYLNEURAMINSÄUREN

Drüsen des Atmungs-, Verdauungs- (z.B. Speicheldrüsen und Leber) und Genitaltrakts produzieren täglich große Mengen von Glykoproteinen. Das heißt, daß die Glykoprotein- und damit auch die Acylneuraminsäurebiosynthese Prozesse sind, die intensiv in diesen Organen ablaufen müssen.

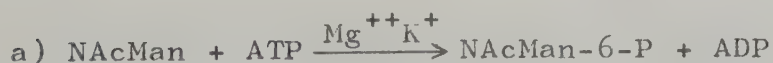
Es gibt zwei Systeme, wodurch N-Acetylneuraminsäure biosynthetisiert werden kann; ein bakterielles und eines, das in Säugetierorganismen gefunden wurde.

Bei dem ersten kondensieren N-Acetyl-mannosamin und Phosphoenolpyruvat zu N-Acetylneuraminsäure unter Freisetzung von Phosphat.



Das Enzym, das diese Reaktion katalysiert, wurde aus dem Bakterium *Neisseria meningitidis* isoliert (60-62). Die Reaktion ist irreversibel, und das Enzym braucht Mn^{++} und SH-Gruppen. Es ist für die genannten Substrate spezifisch.

Im Säugetierorganismus muß einer entsprechenden Kondensation eine Phosphorylierung des N-Acetylmannosamins vorausgehen.



Die Phosphorylierung wird von einer Kinase (ATP : N-Acetamid-2 -desoxy -D- mannose phosphotransferase) katalysiert, die aus Rattenleber isoliert wurde (63-66). Das Enzym ist spezifisch für N-Acetylmannosamin und N-Glykolylmannosamin. Mannosamin und andere Hexosamine werden nicht phosphoryliert. ATP kann nicht von UTP, GTP oder CTP ersetzt werden.

In einer zweiten Reaktion wird N-Acetylneuraminsäure -9-Phosphat aus N-Acetylmannosamin-6-Phosphat und Phosphoenolpyruvat gebildet.



Das Enzym, das diese Reaktion katalysiert, (Phosphoenolpyruvat: N-Acetamid-2-desoxy -D-mannose-6-Phosphat Ligase) wurde aus Rinder- und Schweinesubmaxillarisdrüsen, aus Rattenleber und vom Seeigel isoliert. N-Glykolylmannosamin-6-Phosphat kann in der Reaktion die entsprechende N-Acetylverbindung ersetzen (67). Oxaloacetat und Pyruvat reagieren aber nicht anstelle von Phosphoenolpyruvat.

Anschließend wird die Phosphatgruppe am C₉ abhydrolysiert.



Der dritte Schritt kann von unspezifischen Phosphatasen katalysiert werden; das Enzym aber, das in den Submaxillarisdrüsen vorkommt, ist wahrscheinlich spezifisch. Es spaltet z.B. nicht die Phosphogruppe von N-Acetylmannosamin 6-Phosphat. Eine spezifische N-Acetylneuraminsäure -9- Phosphatase wurde aus menschlichen Erythrozyten isoliert (68).

Alle drei Reaktionen sind irreversibel.

Das die drei Reaktionen katalysierende Enzymsystem ist löslich und wurde in Rattenleber (63), in Dickdarmschleimhaut vom Schaf (69,70) und auch in Schafgehirn (71) nachgewiesen.

Eine andere Möglichkeit, N-Acetylneuraminsäure enzymatisch zu synthetisieren, besteht in der Reaktion zwischen Pyruvat und N-Acetylmannosamin.



Das Enzym, das an dieser Reaktion beteiligt ist, ist die N-Acetylneuraminsäurealdolase (N-Acetylneuraminat-pyruvat-Lyase, E.C.4.1.3.3) und wurde aus *Vibrio cholerae* (72) und aus *C1. perfringens* (12,73) isoliert. Diese N-Acetylneuraminsäure-

aldolase kommt auch in E. Coli K-235 und in verschiedenen tierischen Geweben vor (74).

Dieses Enzym spielt aber bei der N-Acetylneuraminsäurebiosynthese keine Rolle, da die Gleichgewichtskonstante so liegt, daß unter physiologischen Bedingungen keine Synthese möglich ist. Außerdem ist das Enzym in Geweben, in denen die N-Acetylneuraminsäurekonzentration hoch ist, (z. B. Submaxillarisdrüsen) nicht vorhanden.

In Richtung Synthese ist das Enzym für N-Acetylmannosamin und N-Glykolyldmannosamin spezifisch. Pyruvat kann nicht durch Phosphoenolpyruvat oder Oxaloacetat ersetzt werden (74).

In Richtung Spaltung reagiert das Enzym mit verschiedenen Acylneuraminsäuren aber mit verschiedenen Geschwindigkeiten. Der N-Acylsubstituent (75) (N-Glykolyld, N-Monochloracetyl, N-Formyl, N-Succinyl, N-carbobenzoxy (76)) hat auf die Enzymaktivität wenig Einfluß. Dagegen sinkt bei dem N-Acetyl-4-O-acetyl- bzw., N-Acetyl-7-O-acetyl-derivat die Spaltungsgeschwindigkeit um ca. 30% bzw. 40%. Die O-Acetylierung an der Stelle 8 hat keinen Einfluß auf die Reaktion (75). Die N-Acetylneuraminsäure in einer glykosidischen Bindung (73,77) sowie der Methylester (75) werden vom Enzym nicht angegriffen.

Damit die N-Acetylneuraminsäure, die stets in geringen Mengen in den entsprechenden Geweben nachgewiesen werden kann (78), auf Glykoproteine oder Ganglioside übertragen wird, muß sie zuerst aktiviert werden. Dieses erfolgt durch die Reaktion mit CTP unter Einfluß der CMP-N-Acetylneuraminat Synthase (Cytidin 5'-monophosphosialat-Synthase; CTP:N-Acetylneuraminat Cytidylyltransferase E.C.2.7.7.c.)



Dieses Enzym wurde aus Schweinesubmaxillarisdrüsen (79,80),

aus *Neisseria meningitidis* (60,81) und aus *E. Coli* K-235 (80) isoliert. Es scheint ziemlich weit verbreitet zu sein, da es auch in verschiedenen wirbellosen Tieren gefunden wurde (82). In der Retina vom Schweineauge ist das Enzym überraschenderweise im Zellkern lokalisiert (83).

Das Enzym aus Schweinesubmaxillarisdrüsen kann N-Acetyl- und N-Glykolylnneuraminsäure umsetzen. Dagegen kann das Enzym aus *N. meningitidis* mit N-Acetyl-4-O-acetyl- aber nicht mit N-Glykolylnneuraminsäure reagieren. Die Enzyme sind für CTP spezifisch, brauchen Mg^{++} - Ionen und SH-Gruppen. Beide reagieren nicht mit N-Acetylneuraminsäure 9-Phosphat.

Die Reaktion ist reversibel, aber in ganz geringen Proportionen (80). Das Verhältnis Synthesereaktion: Spaltreaktion ist gleich 1000:1.

Bei der Reaktion bildet sich ein seltener Zuckernukleotidtyp - ein Monophosphat. Alle anderen Monosaccharide werden durch eine Pyrophosphatbrücke an ihre Nukleotide gebunden.

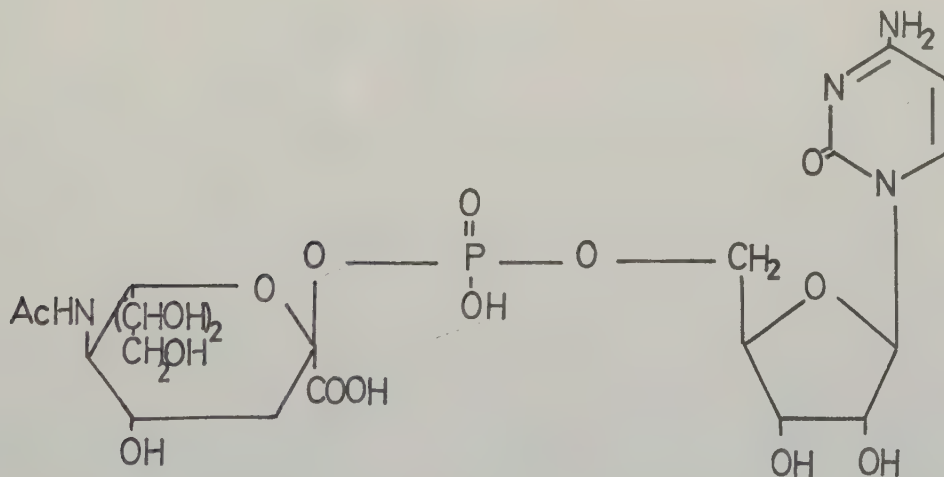


Abb. 4: Struktur der Cytidinmonophosphat-N-Acetylneuraminsäure

Cytidin- 5'-monophospho-N-Acetylneuraminsäure wurde zum ersten Mal aus *E. Coli* K-235 isoliert (84). Die Bindung der N-Acetylneuraminsäure am Phosphat des CMP-Restes ist glykosidisch und wahrscheinlich β (77). Sie wird sowohl von 5'-Nukleotidase und von Phosphodiesterase aus Schlangengift als auch von Phospha-

tasen und N-Acetylneuraminsäurealdolase nicht angegriffen (77).

Im folgenden Bild ist der beschriebene Biosyntheseweg der N-Acetylneuraminsäure und ihr Transfer auf Glykoproteine und Ganglioside zusammen mit einer Skizze der Entstehung des N-Acetylmannosamins (85-89) bei Säugetieren zusammenfassend dargestellt.

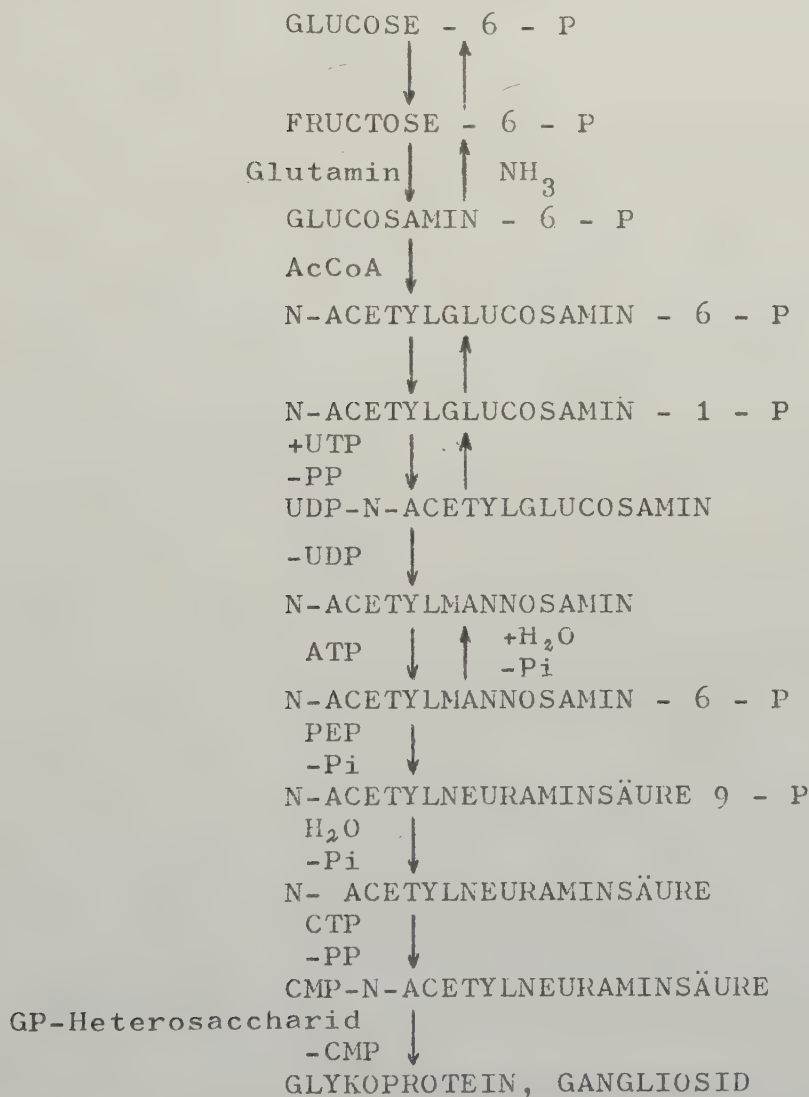


Abb. 5: Biosyntheseweg der N-Acetylneuraminsäure und ihr Transfer auf Glykoproteine und Glykolipide

Der nächste Schritt der Biosynthese ist der Transfer der CMP-N-Acetylneuraminsäure auf geeignete Akzeptoren mittels

Acylneuraminsäuretransferasen. Dieser Vorgang wird im Zusammenhang mit der Glykoproteinbiosynthese in Kap. 4 geschildert.

Während die Biosynthese der N-Acetylneuraminsäure schon aufgeklärt war, blieb die Bildung aller anderen Acylneuraminsäuren lange unbekannt. In den letzten Jahren aber wurde die Biosynthese der N-Glykoly- sowie die der N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure näher untersucht.

Eine Reihe von Versuchen zeigte, daß die N-Glykolygruppe durch direkte Oxidation der N-Acetylgruppe entsteht und nicht durch Übertragung einer vorgefertigten Glykolygruppe auf die Neuraminsäure (90,91). Radioaktiv markiertes N- $[1-^{14}\text{C}]$ -Acetylglucosamin und N- $[1-^{14}\text{C}]$ -Acetylneuraminsäure lieferten in Inkubationsversuchen mit Schnitten der Schweinesubmaxillarisdrüsen N- $[1-^{14}\text{C}]$ -Glykolyneuraminsäure, die nur in der N-Glykolygruppe markiert war (90,91). Das wies auf eine direkte Umwandlung der N-Acetyl- in die N-Glykolygruppe vermutlich durch eine Hydroxylase hin. Die Existenz von einer Monooxygenase wurde in Versuchen mit $^{18}\text{O}_2$ erhärtet; es konnte nachgewiesen werden, daß das neue eingebaute O-Atom der Glykolygruppe aus dem angebotenen molekularen $^{18}\text{O}_2$ stammte (92). Weitere Untersuchungen am partikelfreien Zellhomogenat von Schweinesubmaxillarisdrüsen zeigten eine direkte Hydroxylierung sowohl freier als auch am Glykoprotein der Mikrosomen gebundener N-Acetylneuraminsäure. Das Enzym, teils löslich und teils an den Mikrosomen gebunden, benötigt Ascorbat oder NADPH und Fe^{++} (93,94) (N-Acetylneuraminat, Ascorbat oder NADPH : O_2 -Oxidoreduktase (N-Acetylhydroxylierend), E.C. 1.14. 1 oder 2)

Das Problem der O-Acetylierung wurde mit Rinder- und Pferdesubmaxillarisdrüsen studiert, da dieses Gewebe besonders reich an O-acetylierter N-Acetylneuraminsäure ist. (Die Acylneuraminsäuren im Submaxillarmucin des Rindes zeigen folgende Zusammensetzung: NeuNG1 15%, NeuNAc 25%, NeuNAc-7-OAc 25%, NeuNAc-8-OAc 25%, NeuNAc-7,8-diOAc 10% (21)).

Gewebeschnittversuche mit radioaktiv markiertem $[1-^{14}\text{C}]$ -Acetat

zeigten, daß die Markierung der O-Acetylgruppe schneller erfolgt als die der N-Acetylgruppe der Neuraminsäure (21). Andere Versuche mit $[1-^{14}\text{C}]$ -Acetat und Hemmversuche mit Puromycin erbrachten die Bildung eines freien (noch nicht am Glykoprotein gebundenen) O-Acetyl-Derivates der Neuraminsäure mit hoher spezifischer Radioaktivität - höher als die der am Glykoprotein gebundenen entsprechenden Acylneuraminsäure (21,95). Alles das wies darauf hin, daß das N-Acetylneuraminsäuremolekül und nicht eine seiner Vorstufen-Substanzen den Akzeptor für die O-Acetylgruppen darstellt. In späteren Versuchen konnte gezeigt werden, daß das partikelfreie Homogenat von Rindersubmaxillarisdrüsen die freie N-Acetylneuraminsäure ins N-Acetyl-O-acetylderivat umwandelt (95). Das an den Mikrosomenmembranen gebundene Enzym O-acetyliert sowohl die freie als auch die mikrosomal gebundene N-Acetylneuraminsäure (94). Das Enzym wurde AcetylCoA : N-Acetylneuraminat-7-oder/und 8-O-acetyltransferase (n) (EC 2.3.1.?) genannt.

An diesen Punkt der Kenntnisse über die Acylneuraminsäurebiosynthese schließt sich die vorliegende Arbeit an. Mehr Einzelheiten über die N-Acetylhydroxylierung und besonders über die O-Acetylierung werden in Kapitel 6 im Zusammenhang mit der Besprechung der Problemstellung dieser Arbeit gebracht.

4. ACYLNEURAMINSÄUREN: BESTANDTEILE VON GLYKO- PROTEINEN UND GANGLIOSIDEN

Wie schon erwähnt, sind Acylneuraminsäuren wichtige Bestandteile von Glykoproteinen und Gangliosiden.

Die Glykoproteine sind alle nach einem Grundschemata aufgebaut: Sie haben eine Polypeptidkette, woran Oligosaccharidketten verschiedener Länge durch Hauptvalenzen gebunden sind. Als häufigste Zuckerkomponenten sind bekannt: D-Glucose, D-Galaktose, D-Mannosamin, L-Fucose, N-Acetyl-D-Glucosamin, N-Acetyl-D-Galaktosamin, D-Acylneuraminsäuren.

Es gibt zwei Grundtypen von Glykoproteinen, den Mucintyp und den Serumtyp.

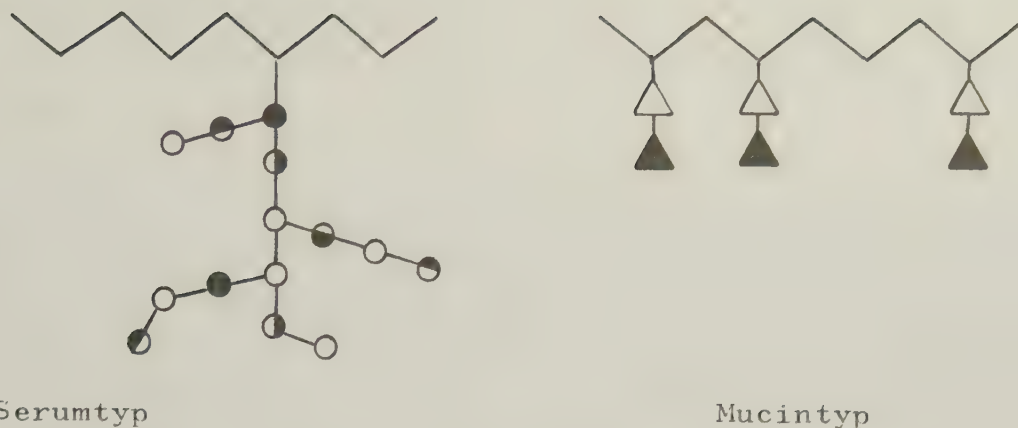


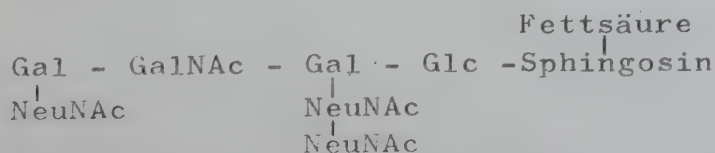
Abb. 6 Die Grundtypen der Struktur von Glykoproteinen

Der Serumtyp enthält eine (Ribonuclease B, (96) Ovalbumin (97)) oder wenige (α_1 -saures Glykoprotein (98), menschliches IgG Immunoglobulin (99)) große (bis 17 Monosaccharideinheiten (100)), manchmal verzweigte Oligosaccharid-Einheiten pro Molekül. Der Mucintyp enthält viele (800 beim Schafsubmaxillarmucin (101)) kleine Oligosaccharidketten pro Molekül.

Die Moleküle vom Serumtyp besitzen eine überwiegend globuläre Form, während die vom Mucintyp mehr fadenförmig erscheinen.

Die Peptidzuckerbindung beim Serumtyp ist eine N-glykosidische Bindung zwischen Asparagin und N-Acetylglucosamin. Diese Bindung ist alkali-stabil. In Glykoproteinen aus Mucinen ist der Zuckerrest an das Protein durch O-glykosidische Bindung angeheftet. Das erste Monosaccharid der Kette - oft N-Acetylgalactosamin (102) - ist an Serin oder Threonin gebunden. Die Bindung ist alkali-labil.

Die Acylneuraminsäuren besitzen immer eine endständige Position in der Oligosaccharidkette, oder sie sind seitenständig an Monosaccharide innerhalb der Kette gebunden. Sie wurden jedoch nie zwischen zwei Monosaccharidresten eingebaut vorgefunden. Die Acylneuraminsäure wird immer α -glykosidisch an D-Galactose (Stelle 3 oder 6) an N-Acetyl-D-Galactosamin (Stelle 6) und in Gangliosiden auch an einen anderen Acylneuraminsäurerest (Stelle 8) gebunden, wie z.B. für ein Gangliosid-Molekül gezeigt wird:



Im folgenden wird kurz der Mechanismus der Glykoproteinbiosynthese dargestellt, da er mit dem Transfer der Acylneuraminsäuren und auch mit den Reaktionen zur Modifikationen der N-Acetylneuraminsäure (s. Kap. 6) eine funktionelle Einheit darstellt.

Die Biosynthese dieser Kohlenhydrat enthaltenden Polymeren erfolgt im Gegensatz zur Biosynthese von anderen Polymeren wie Proteinen oder Nukleinsäuren nicht durch einen Matrizenmechanismus. Sie werden von einem spezifischen Enzymkomplex synthetisiert. Jeder Monosaccharidrest wird schrittweise von seinem Nukleotidderivat auf einen geeigneten Akzeptor transferiert, und jeder Transfer wird von einer anderen Glykosyltransferase katalysiert. Die Glykosyltransferasen sind sowohl in Bezug auf das Zuckernucleotid als auch auf den Akzeptor sehr spezifisch. In Bezug auf das Zuckernucleotid sind der Nucleotidrest und der Zucker bestimmende Faktoren (Donorspezifität). In Bezug auf den Akzeptor sind verschiedene Eigenschaften wichtig, vor allem welcher Zucker am Ende der Kette sitzt. Außerdem spielen die Natur des vorletzten Zuckers, die Art der Bindung zwischen letztem und vorletztem Zucker, die Länge der Peptidkette und wahrscheinlich noch die Aminosäurezusammensetzung (103) in der Nähe der Bindung Peptid-Kohlenhydrat eine Rolle (104). Das Produkt einer Reaktion bestimmt so den nächsten Schritt, und die Struktur der Kohlenhydrateinheiten wird durch die Anwesenheit und die Spezifität der Glykosyltransferasen bestimmt. Ein spezifischer Glykosyltransferasenkomplex, als Multiglycosyltransferasesystem bezeichnet, katalysiert die Synthese der Oligosaccharidkette in Glykoproteinen und in Gangliosiden (104).

Neuerdings wurden Verbindungen isoliert, bei denen Monosaccharide an Lipide (Dolichol, etc.) gebunden wird und denen eine Rolle bei der Biosynthese von Glykoproteinen zugesprochen wird (105)

Bis heute ist zum größten Teil unbekannt, wodurch die Biosynthese der Kohlenhydratkette beendet und durch welches Zeichen das Glykoprotein vom Ort seiner an den Mikrosomen stattfindenden Biosynthese abgelöst wird. Es wird vermutet, daß der Transfer eines spezifischen Zuckers - neben Fucose insbesondere N-Acetylneuraminsäure - oder eine spezifische sterische Konfiguration (α -N-Acetylgalactose, α -Galactose in den Blutgruppensubstanzen A und B) die weitere Verlängerung der Kette stoppen

könnte (106). (Die anderen glykosidischen Bindungen in der Kette sind stets β). In einigen Fällen wird vermutet, daß der Transfer von Fucose (107) oder von N-Acetylneuraminsäure (108) nicht nur das Zeichen für das Ende der Biosynthese darstellt, sondern auch bei der Sekretion eine Rolle spielt. Diskutiert wird, daß der Kohlenhydratanteil in Glykoproteinen Voraussetzung für den Transport dieser Makromoleküle durch die Zellmembran ist (109).

Es schließt sich jetzt die Frage nach dem Ort der Glykoproteinbiosynthese an. Nachdem die Peptidkette entsprechend dem klassischen Schema der Proteinbiosynthese in den Ribosomen synthetisiert wurde, wandert sie durch die Kanäle des endoplasmatischen Retikulums. Währenddessen übertragen dort membrangebundene Glykosyltransferasen, wie z.B. autoradiographisch nachgewiesen werden konnte (110), schrittweise die Monosaccharideinheiten auf die wachsende Kohlenhydratkette. Das Molekül erreicht dann den Golgiapparat, wo es bis zur Sekretion aus der Zelle aufbewahrt wird.

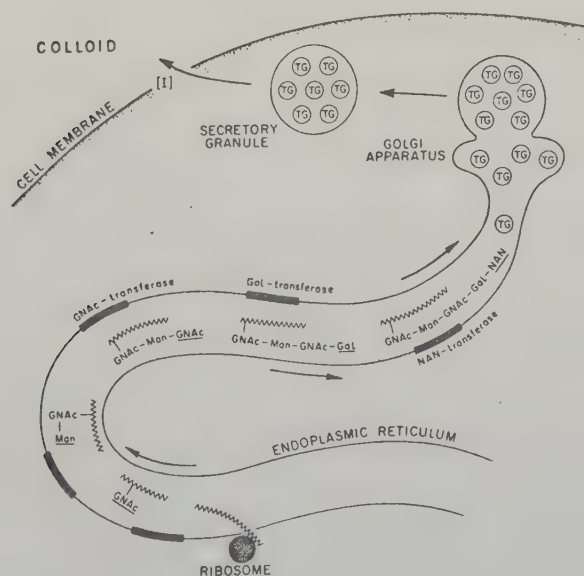


Abb. 7: Schema des subzellulären Ortes der Biosynthese eines Glykoproteinmoleküls, nach R.G. Spiro (100).

Von besonderem Interesse ist der Mechanismus der Bindung des ersten Monosaccharids an die Proteinkette. Viele Versuche (111-113) weisen darauf hin, daß der erste Zucker auf die Proteinkette übertragen wird, noch solange diese an den Ribosomen gebunden ist. Eine Reihe von anderen Versuchen sprechen allerdings dagegen (114-118), so daß die Frage nach dem Ort und nach dem Mechanismus der Bindung des ersten Zuckerrestes noch offen bleibt.

Die Glykosyltransferasen sind im Bereich des endoplasmatischen Retikulums (119) und des Golgi-Apparates (100) wie auch des Ribosomen haltigen Ergastroplasma (119) lokalisiert und dienen zum Teil als Leitenzyme für die jeweiligen subzellulären Strukturen (120).

5. EINFLUSS VON ACYLNEURAMINSÄUREN AUF DIE FUNKTIONEN VON GLYKOPROTEINEN UND GANGLIOSIDEN

Acylneuraminsäuren beeinflussen die biologischen Eigenschaften vieler Glykoproteine und Ganglioside. Diese beiden Gruppen von Substanzen sind weit verbreitet; sie werden praktisch von jeder Zelle synthetisiert. Fast so breit wie ihr Vorkommen ist das Spektrum ihrer Funktionen. Hier werden nur die Funktionen besprochen, die von den Acylneuraminsäuren beeinflusst werden.

a. ERHÖHUNG DER VISKOSITÄT VON GLYKOPROTEINEN IN WÄSSRIGER LÖSUNG ("SCHLEIM")

Glykoproteine sind für die hohe Viskosität von schleimigen Sekretionen der Atemwege, des Verdauungskanals, des Urogenitaltrakts und der Augenhöhle verantwortlich. Zu den hohen Viskosität wässriger Glykoproteinlösungen tragen das hohe Molekulargewicht wie auch die Acylneuraminsäurereste mit ihren sich abstoßenden negativen Ladungen bei. Wegen ihrer niedrigen pK-Werte (Kap. 2) sind die Carboxylgruppen der Acylneuraminsäurereste bei physiologischem pH völlig dissoziiert. Spaltet man die Acylneuraminsäuren von den Glykoproteinen ab, dann sinkt die Viskosität schnell (121).

Die schleimigen Glykoproteinlösungen sind lebensnotwendig. Sie haben eine Schutzwirkung gegen mechanischen und chemischen Angriff. Sie fungieren als Schmiermittel bei Bewegungen des Augapfels, beim Transport von Nährstoffen durch den Magendarmkanal (sie hüllen die Nahrungsstoffe ein und machen sie gleitfähig) und bei Funktionen des Urogenitaltrakts, indem sie den Coitus und den Geburtsvorgang erleichtern. Sie schützen die Epithelzellen im Magen gegen Proteolyse. Im Schleim, der die Atemwege bedeckt, werden Fremdkörper, Bakterien, Viren abfangen, wodurch die Lungen steril gehalten werden. In ähnlicher Weise schützt der Schleimpfropf im Halskanal der Gebärmutter den Uterus gegen die Bakterien der Scheide.

b. ANDERE FUNKTIONEN BEI DER FORTPFLANZUNG

Im Ejakulat des Ebers kommt ein neuraminsäurereiches saures Glykoprotein vor, das mit einem basischen Protein zu einem Netzwerk verklumpt, aus dem Spermien über längere Zeit abgegeben werden (122). Acylneuraminsäuren sind Bestandteile der zona pellucida der Eizelle von Säugetieren (123). Wenn sie abgespalten werden, verliert die Eizelle (Kaninchen) ihre Elastizität und Spermatozoen können nicht mehr in sie eindringen (124).

c. SCHUTZ VON MAKROMOLEKÜLEN VOR PROTEOLYTISCHEM ANGRIFF

Der Intrinsic Faktor (ein Glykoprotein) verliert seine biologische Aktivität - nämlich die Bindung von Vitamin B₁₂ - nach Inkubation mit Neuraminidase (125,126). Nach Abspaltung der Acylneuraminsäure ist er der Einwirkung der Verdauungsenzyme stärker ausgesetzt als die ursprüngliche intakte Substanz. Der Acylneuraminsäurerest bewahrt als terminaler Baustein den Vitamin-B₁₂-Rezeptor vor der Proteolyse (127).

Die Zellen der Magenschleimhaut werden gegen den Angriff von Proteasen durch die Acylneuraminsäure enthaltenden Glykoproteine ihrer Zellmembranen geschützt (128).

d. REGULATION DES PHYSIOLOGISCHEN VERHALTENS VON ZELLEN UND MAKROMOLEKÜLEN

Glykoproteine vom Blutplasma, die wichtige biologische Funktionen ausüben, wie α_1 -Glykoprotein, Ceruloplasmin, Haptoglobulin, Laktoferrin, menschliches Choriongonadotropin, Follikelstimulierendes Hormon etc., werden nach Verlust der Acylneuraminsäuren schnell durch die Leber aus der Blutbahn entfernt (129). Es konnte gezeigt werden, daß diese Glykoproteine nach Abspalten der Acylneuraminsäuren von Plasmamembranen der Leberzellen adsorbiert werden (130).

Neuraminidasebehandelte Lymphozyten werden nicht wie normalerweise von den Lymphknoten, bzw. von der Milz, sondern vor

allem von der Leber aufgefangen. Die Acylneuraminsäuren an der Oberfläche von Lymphozyten regulieren demnach die normale Verteilung dieser Zellen im Körper (131).

Acylneuraminsäure als Bestandteil der Zelloberfläche schützt die Erythrozyten gegen Phagozytose durch Makrophagen des Mäuse-Peritoneums (132).

e. EINFLUSS AUF OBERFLÄCHENLADUNG, AGGREGATION UND FORM VON ZELLEN

Acylneuraminsäuren verleihen Zellhüllen wegen ihrer negativen Ladung eine gewisse Festigkeit (133) und beeinflussen den Zusammenhalt von Zellen im Organverband. Abspaltung der an der Zelloberfläche hauptsächlich an Glykoproteinen (134,135) gebundenen Acylneuraminsäure von den Thrombozyten verursacht eine spontane Aggregation dieser Zellen (136). Dasselbe wurde mit Myeloblasten Leukämiekranker beobachtet (137).

f. ROLLE IN DER IMMUNOLOGIE

Die MN-Blutgruppensubstanzen auf der Oberfläche von Erythrozyten sind Glykoproteine. Behandlung der Erythrozyten mit Neuraminidase führt zum Verlust dieser Antigen-Eigenschaften (138-140).

Experimente haben gezeigt, daß Acylneuraminsäuren der Zellmembranen zelluläre Antigene verdecken: Sie vermindern die immunochemischen Reaktionen von gesunden sowie von Krebszellen (141,142). Das wurde durch folgendes Experiment gezeigt: Sarkomzellen von Mäusen, mit Neuraminidase behandelt und in Mäuse der gleichen Spezies injiziert, verhindern die Entwicklung massiver Tumoren. Bei der gleichen Tierart treten ohne Neuraminidase-Behandlung der Tumorzellen tödliche Geschwülste auf (143).

g. BINDUNG UND TRANSPORT VON MOLEKÜLEN

Einige Viren können sich an Zellen mit Hilfe von dort membrangebundenen Acylneuraminsäuren anlagern. Auf diese Weise werden rote Blutkörperchen durch die Myxoviren agglutiniert (144-146). Das Virus enthält das Enzym Neuraminidase, das

die Acylneuraminsäure abspaltet, und noch ein weiteres Protein, das Hämagglutinin. Beide Virusproteine ermöglichen aufgrund einer hohen Affinität zur Acylneuraminsäure die Adsorption der Viren an die Erythrozyten und damit deren Agglutination (146). Neuraminidase-behandelte Erythrozyten sind nicht mehr agglutinierbar. Der hier beschriebene Mechanismus der Adsorption von Viren an Säugetierzellen scheint die Infektion dieser Zellen mit Viren einzuleiten (146,147)

Acylneuraminsäuren sind am Kaliumtransport durch Zellmembranen beteiligt (148) und dienen in der glatten Muskulatur als Rezeptor für Serotonin (149).

Innerhalb der Klasse der Acylneuraminsäuren wird den O-acetylierten Derivaten eine besondere Funktion zugesprochen.

Die O-Acetylgruppen behindern den Abbau des Acylneuraminsäure- und damit des ganzen Glykoprotein- oder Gangliosidmoleküls. Da die 7-O- und 8-O-Acetyl-derivate durch Neuraminidase langsamer als die N-Acetylneuraminsäure gespalten werden und das 4-O-Acetyl-derivat nicht spaltbar ist (20) (Kap. 2), dürfte die O-Acetylierung einen Schutz für die Zellglykoproteine vor bakterieller Neuraminidase darstellen. Ob das auch für Virus- und Wirbeltier-Neuraminidase gilt, wurde noch nicht untersucht. Die Zellstrukturen bleiben vor weiteren Angriffen durch andere Glykosidasen und zuletzt durch Proteasen geschützt. Auch die N-Acetylneuraminsäure-Aldolase, das Enzym des Acylneuraminsäureabbaus, greift O-Acetyl-derivate langsamer als N-Acetylneuraminsäure an (75) (Kap. 3). Daher spielt die O-Acetylierung für die Erhaltung der Zellstrukturen eine wichtige Rolle. O-Acetylgruppen am Peptidoglykan der Zellwand von *Micrococcus lysodeikticus* machen das Bakterium gegen Lysozym resistent (150,151). Die Fähigkeit der Zellwand von *Staphylococcus aureus* H, den Bakteriophagen 52A zu inaktivieren, geht verloren, wenn die O-Acetylgruppen an Stelle 6 der Muraminsäure abgespalten werden (152). Einige Bakterien besitzen als Baustein der Polysaccharidkette in der Zellwand O-Acetylierte Zucker (s. Kap. 2 a.), die immunologisch eine Rolle spielen (41-46).

6. PROBLEMSTELLUNG

Wie im Kapitel 3 schon kurz erwähnt, arbeitete man, als diese Arbeit in Angriff genommen wurde, schon über die Biosynthese der N-Glykoly- sowie der verschiedenen N-Acetyl-O-acetylneuraminsäuren. Man hatte sich die Frage gestellt, auf welcher Stufe der Biosynthese der betreffenden Acylneuraminsäuren die Modifizierung des Moleküls - Oxydation der N-Acetylgruppe oder Acetylierung der Hydroxylgruppen - stattfindet. Man hatte Hinweise, daß die Modifizierung des N-Acetylneuraminsäuremoleküls auf der Stufe der freien (noch nicht am Glykoprotein-gebundenen) N-Acetylneuraminsäure erfolgt.

Im Fall der N-Glykolylnneuraminsäure sprachen dafür:

- a) Nach Versuchen mit radioaktiven Precursors ($[1-^{14}\text{C}]$ -Acetat) fand man die spezifische Radioaktivität der freien, der membrangebundenen und der am löslichen Glykoprotein des Cytosols gebundenen N-Glykolylnneuraminsäure in folgender Reihenfolge (90,153):

freie > an Glykoprot. von Membranen gebundene > am Glykoprot. des Cytosols gebundene NeuNGl

- b) Puromycin hatte keine Hemmwirkung auf die Bildung freier N-Glykolylnneuraminsäure, erniedrigte aber die spezifische Radioaktivität der membrangebundenen N-Glykolylnneuraminsäure um 24% und dieder am löslichen Glykoprotein des Cytosols gebundenen N-Glykolylnneuraminsäure um 77% (153).
- c) Im zellfreien System oxidiert die lösliche (93) und die membrangebundene (94) N-Acetylneuraminsäure-Hydroxylase die freie N- $[1-^{14}\text{C}]$ -Acetyl- zu N- $[1-^{14}\text{C}]$ -Glykolylnneuraminsäure.
- d) CMP-N-Glykolylnneuraminsäure konnte aus Schweinesubmaxillarisdrüsen in geringen Mengen isoliert werden (154).

Die O-Acetylierung der N-Acetylneuraminsäure in Position 7 u. 8 in Rindersubmaxillarisdrüsen findet analog mindestens zum Teil auch auf der Stufe der freien N-Acetylneuraminsäure statt. Hierauf deuten folgende Tatsachen hin:

- a) In Versuchen mit Schnitten der Rindersubmaxillarisdrüsen in Anwesenheit von $[1-^{14}\text{C}]$ -Acetat wurden die spezifischen Radioaktivitäten der O-Acetylgruppen in der freien, in der membrangebundenen und in der am löslichen Glykoprotein des Cytosols gebundenen 7(8)-O-Acetyl-N-Acetylneuraminsäure untersucht. Sie standen in der Reihenfolge (21,95):

freie > am Glykoprotein von Membranen gebundene > am Glykoprotein des Cytosols gebundene N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure.

- b) Unter Einwirkung von Puromycin änderte sich die spezifische Radioaktivität der freien 7(8)-O-Acetyl-N-Acetylneuraminsäure nicht, die der membrangebundenen ging etwas zurück und die der am cytosolischen Glykoprotein gebundenen fiel um 80-85% ab (95). Das wies auch darauf hin, daß die freie N-Acetylneuraminsäure das Substrat der O-Acetylierung darstellt.
- c) Im zellfreien System von Rindersubmaxillarisdrüsen - im partikelfreien Homogenat (95) und in Versuchen, in denen enzymhaltige Zellmembranpräparationen (94) eingesetzt wurden - wurde aus freier $[1-^{14}\text{C}]$ -N-Acetylneuraminsäure N- $[1-^{14}\text{C}]$ -Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure gebildet.
- d) CMP-N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure wurde in kleinen Mengen aus Rindersubmaxillarisdrüsen isoliert (154).

Diese Experimente zeigten, daß sowohl die Hydroxylierung als auch die O-Acetylierung auf der Stufe der freien N-Acetylneuraminsäure erfolgen kann. Dabei blieb aber ungeklärt ob die N-Acetylneuraminsäure selbst, ihr CMP- oder ihr 9-Phosphatderivat das beste, bzw. physiologisch bevorzugte Substrat für diese Enzymreaktionen darstellt.

In Frage könnten auch N-Acetylhexosamine als Vorstufensubstanzen dieser Modifizierungen kommen. Das wurde jedoch für den Fall der Hydroxylierung ausgeschlossen, weil keine N-Glykolyhexosamine aus Schweinesubmaxillarisdrüsen isoliert bzw. enzymatisch synthetisiert werden konnten (155). Für den Fall der O-Acetylierung ist das ebenfalls unwahrscheinlich; zumindest bei der Biosynthese der N-Acetyl-4-O-acetylneuraminsäure scheidet diese Möglichkeit aus: es scheint aus energetischen Gründen unwahrscheinlich, daß die glykosidische OH-Gruppe des N-Acetylmannosamins, die zur 4-OH Gruppe der Acylneuraminsäuren wird, vor der Kondensation mit Phosphoenolpyruvat schon O-acetyliert ist.

Zu überlegen blieb noch die Frage, ob auch die bereits am wachsenden Glykoprotein der Mikrosomen gebundene N-Acetylneuraminsäure oder die am fertigen Cytosol-Glykoprotein gebundene N-Acetylneuraminsäure modifiziert werden kann. Experimente zeigten, daß das erste möglich ist:

Membran-gebundene Enzyme modifizierten N-Acetylneuraminsäure von den mikrosomalen Glykoproteinen (94). Dagegen nahm die N-Acetylneuraminsäure in fertigen Glykoproteinen des Cytosols keine O-Acetylgruppe mehr auf (95).

Zusammenfassend kann man aufgrund dieser von der Literatur bekannten Ergebnisse sagen, daß die verschiedenen Acylneuraminsäuren zum Teil auf der Stufe der freien Acylneuraminsäuren gebildet werden und erst dann auf die wachsende Glykoproteinkette über-

tragen werden. Der andere Teil dürfte erst nach dem Transfer modifiziert werden. Jedoch können noch keine Aussagen über quantitative Verhältnisse dieser beiden Substrate sowohl bei der Hydroxylase wie auch bei der in dieser Arbeit untersuchten Acetyltransferase aus den Rindersubmaxillarisdrüsen gemacht werden.

Um aufzuzeigen, welches der diskutierten Substrate den besten Akzeptor für O-Acetylgruppen darstellt, mußte eine geeignete Enzympräparation hergestellt werden. Es war bekannt, daß sowie die Hydroxylase als auch die O-Acetyltransferase des Rindes an Mikrosomen gebunden sind (94), aber auch zum Teil in löslicher Form im partikelfreien Homogenat (93,95) der betreffenden Submaxillarisdrüsen vorkommen. Daher stellte sich die Aufgabe, entweder mit einer löslichen Enzympräparation zu arbeiten, oder, wenn der Erhalt einer solchen misslingen sollte, die Studien über die Substratspezifität mit dem partikulären Enzym durchzuführen. Bevor dies aber geschehen konnte, mußte das bisher noch nicht näher charakterisierte Enzym zunächst auf seine Eigenschaften untersucht werden. Diesem Ziel widmet sich der Hauptteil dieser Arbeit.

Um weitere Aussagen über die Substratspezifität zu erhalten, war die Synthese von radioaktiver N-Acetylneuraminsäure mit hoher spezifischer Aktivität aus Methoxyneuraminsäure, sowie von radioaktiver CMP-N-Acetylneuraminsäure erforderlich. Das auch als Substrat infrage kommende N-Acetylneuraminsäure-9-Phosphat stand noch nicht zur Verfügung.

Da die früheren Versuche die Existenz freier N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure aufzeigten, die aktiviert und auf Glykoproteine übertragen werden muß, sollte die im Homogenat der Rindersubmaxillarisdrüsen vorkommende CMP-N-Acetylneuraminat-Synthase in der Lage sein, die N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure mit CTP zu aktivieren. Auch diesem Problem widmen sich einige Versuche.

EXPERIMENTELLER TEIL

1. SUBSTANZEN

a) bezogene Substanzen

AcCoA-Li₃Salz·3H₂O von Fa. Serva

[1-¹⁴C] Ac-CoA (5,8mCi/mMol) von Fa. Amersham-Buchler

CoA von Fa. Boehringer, Mannheim

N-[1-¹⁴C] Glykolylnuraminsäure (156) (2380 zpm/µg)

CTP-Na₃Salz von Fa. Boehringer, Mannheim

[1-¹⁴C]Acetanhydrid (62mCi/mMol) von Fa. Amersham-Buchler

Neuraminidase aus *Vibrio cholerae*, von den Behringwerken, Marburg.

b) isolierte bzw. synthetisierte Substanzen

I. Isolierung der N-Acetyl- und N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure aus den Rindersubmaxillarisdrüsen.

Mucin wurde aus Rindersubmaxillarisdrüsen durch wässrige Extraktion der Drüsen und Gefriertrocknung des Extraktes gewonnen (20). 2kg Drüsen lieferten 39g Mucin. Die an die Glykoproteine des Mucins gebundenen Acylneuraminsäuren wurden vorsichtig durch Säurehydrolyse unter den folgenden Bedingungen abgespalten:

pH = 2.0-2.5 (Ameisensäure), 70°C, 1Std. Die abgespaltenen Acylneuraminsäuren wurden bei 0°C gegen Wasser dialysiert; die Dialysate wurden eingeengt - unter mehrmaliger Wassergabe zur Entfernung der Ameisensäure - und zuletzt lyophilisiert. Anschließend wurden die Acylneuraminsäuren

auf einer Anionenaustauschersäule (Dowex 2x8, 100-200 mesh, Formiat geladen $\phi=4.5$ cm $h=1$ m) adsorbiert und nach dem Waschen der Säule mit Wasser mit Ameisensäure (0.4M) eluiert. Die Fraktionen, die Acylneuraminsäure enthielten (nach der Bialmethode (59) analysiert) wurden gesammelt, eingengt und gefriergetrocknet. Das Gemisch gefriergetrockneter Acylneuraminsäuren wurden in einem kleinen Volumen n-Butanol:n-Propanol:Wasser = 1:2:1 aufgenommen und auf einer Cellulose-Säule bei 0°C in die einzelnen Acylneuraminsäuren aufgetrennt (20) (s. Abb. 8). (Cellulosepulver 2100 ff, Macherey Nagel and Co., Fließmittel:n-Butanol:n-Propanol:Wasser = 1:2:1, Säule: $\phi=3.6$ cm, $h=120$ cm)

Ausbeute: Gemisch aus N-Acetyl-7-O- und N-Acetyl-8-O-acetylneuraminsäure: 550mg; N-Acetylneuraminsäure: 452mg; N-Glykolyneuraminsäure 213mg.

Die Reinheitsprüfung dieser Acylneuraminsäuren erfolgte durch Dünnschichtchromatographie, durch Esterbestimmung nach Hestrin und durch Vergleich der Farbreaktionen nach der Bial- und der TBA-Methode (s. Exp.-Teil. Kap. 3)

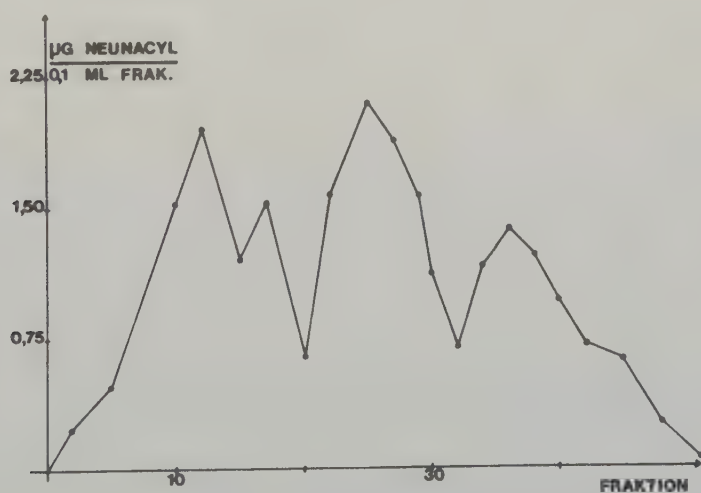


Abb. 8: Elutionsdiagramm für ein Acylneuraminsäuregemisch aus Rindersubmaxillarismucin aus der Cellulose-Säule; Frak. 5-15: NeuNAc-8-OAc; 15-20: NeuNAc-7-OAc; 20-32: NeuNAc; 32-50: NeuNGl.

II. Herstellung des Neuraminsäure- β -Methylglykosids (Methoxyneuraminsäure)

Das Methylglykosid der Neuraminsäure wurde nach Wirtz-Peitz, Schauer und Faillard (157) aus Schweinesubmaxillarisdrüsen gewonnen.

400g gefriergetrocknete und pulverisierte Submaxillarisdrüsen vom Schwein wurden im Soxhlet-Apparat mit Äther entfettet; das entfettete Material wurde mit 1N methanolischer Schwefelsäure am Rückfuß 17 Std. gekocht und anschließend zentrifugiert. Diese Methanolyse wurde mit dem Sediment wiederholt. Die Überstände, die 10.4g Neuraminsäure- β -Methylglykosid-Methylester (nach Bialbestimmung) enthielten, wurden mit Bariumhydroxyd-Lösung auf stark alkalischen pH-Wert gebracht und eine Stunde im kochenden Wasserbad erhitzt, um den Methylester zu verseifen. Die Barium-Ionen wurden als Bariumsulfat ausgefällt, und der klare Überstand wurde auf eine Dowex 50x4 Säule (20/50 mesh; H^+ -geladen; $\phi=8cm$; $h=120cm$) gegeben. Das Methylglykosid wurde mit einem Salzsäure-Gradienten von 0-0.8N Salzsäure aus der Säule eluiert. Die Fraktionen wurden auf Methoxyneuraminsäure und auf Aminosäuren untersucht (1) Farbreaktion nach Bial und 2) Dünnschichtchromatographie auf Cellulose; Fließmittel:n-Butanol n-Propanol:0.1NHCl=1:2:1; Färbung nach Bial und mit Ninhydrin-Reagenz). Die Fraktionen, die das Neuraminsäureglykosid enthielten, wurden über Dowex 1x4 (20/50 mesh, Formiat Form) zur Entfernung der Chlorid Ionen filtriert und schonend zur Trockene, unter mehrfacher Zugabe von Wasser zur Entfernung der Ameisensäure, eingeengt. Die Kristallisation erfolgte aus Dioxan:Wasser=1:1. Die Ausbeute an kristalliner Substanz betrug 900mg (ca. 10%).

III. Synthese der N-[1- ^{14}C]Acetylneuraminsäure

In Anlehnung an die Arbeit von Wirtz-Peitz, Schauer und Faillard (157) wurde zu einer Lösung von 281mg (1mMol) Methoxyneuraminsäure (Krist.) in 5ml Wasser und 2.5 ml Dioxan, 0.6ml Triäthylamin (4.3mMol) zugegeben. Die Mischung wurde in eine Brechampulle, die

[1-¹⁴C] Acetanhydrid (500µCi, 8µMol) enthielt, eingesaugt und 2 Std stehen gelassen. Dann wurden 0.2ml (2.1mMol) kaltes Acetanhydrid und 0.2ml (1.4mMol) Triäthylamin zugegeben.

Die Mischung stand 45 Minuten und wurde nach Zugabe von 10ml Wasser auf eine Dowex 50x4 Säule (H⁺-Form, ϕ=4.5cm h=40cm) aufgetragen, um das Triäthylamin und das nicht umgesetzte Neuraminsäure-β-methylglykosid von dem Produkt abzutrennen. Das N-[1-¹⁴C] Acetyl-neuraminsäure-β-methylglykosid wurde mit Wasser aus der Säule eluiert. Das Eluat wurde schonend auf 65ml eingengt. Das N-Acetylneuraminsäuremethylglykosid wurde durch Zugabe von 105ml 0.04N Salzsäure (Endkonzentration=0.025N) und 17g trockenem Dowex 50x4, H⁺-Form, 1 Std. zur Abspaltung der β-Methylgruppe auf 80°C erhitzt. Das Hydrolysat wurde langsam auf eine Dowex 2x8 Säule (100-200 mesh; Formiat Form; ϕ=2.5cm; h=30cm) aufgetragen, und die Säule erst mit Wasser und dann mit einem Ameisensäuregradienten eluiert (1l Wasser+ 1l 0.8N Ameisensäure). Die N-[1-¹⁴C] Acetyl-neuraminsäure-haltigen Fraktionen wurden gesammelt und eingengt. Die eingengte Lösung enthielt 120mg N-[1-¹⁴C]-Acetyl-neuraminsäure und 27.6µCi. (Spezifische Radioaktivität=0.23µCi/mgNeuNAc). Ausbeute in Bezug auf eingesetzte Methoxyneuraminsäure=39%; Ausbeute in Bezug auf eingesetzte Radioaktivität=5.5%. Die Dünnschichtchromatographie von den N-Acetylneuraminsäure-haltigen Fraktionen zeigte auf Cellulose im Fließmittel n-Butanol:n-Propanol:0.1NHCl = 1:2:1 nur einen radioaktiven Peak (R_F=0.47), der der N-Acetylneuraminsäure zugeordnet werden konnte.

Ein Teil der Versuche wurde mit dieser Substanz und ein späterer Teil mit einer zweiten Charge radioaktiver N-[1-¹⁴C] Acetylneuraminsäure von der spezifischen Radioaktivität 2030 zpm/µg (0.92µCi/mg) durchgeführt.

IV. Synthese der CMP-N-[1-¹⁴C] Acetyl-neuraminsäure

Die synthetisierte N-[1-¹⁴C] Acetyl-neuraminsäure und die angereicherte CMP-N-Acetylneuraminat-Synthase (s.

Exp. Teil 2. a) wurden für die Synthese (158) der CMP-N- $[1-^{14}\text{C}]$ Acetylneuraminsäure gebraucht.

Die Inkubationsmischung enthielt 120mg N- $[1-^{14}\text{C}]$ Acetylneuraminsäure (0.39mMol, spez. Rad. 0.23 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$), 408mg CTP (als tri-Natriumsalz, 0.74mMol), 20ml Tris-MgCl₂-Puffer (9Teile von 1.0M Tris/HCl-Puffer pH=9.0 und 1 Teil von 1.0M MgCl₂), 105 ml Enzympräparation (115E). Die Mischung wurde 1 Std. bei 37°C inkubiert, und anschließend wurden weitere 50ml Enzympräparation (55E) zugegeben. Eine Bestimmung der CMP-N-Acetylneuraminsäure (158) in der Inkubationsmischung ergab, daß sich 80mg N-Acetylneuraminsäure in CMP-N-Acetylneuraminsäure umgesetzt haben. Ausbeute : 66%.

Die Inkubationsmischung wurde auf eine Dowex 1 x 8-Säule (50-100mesh, HCO₃⁻-Form, ϕ =3.5cm; h=77cm) aufgetragen. Nachdem die Säule mit verdünnter NH₃-Lösung (ca. 10⁻³M) gewaschen worden war, konnten N-Acetylneuraminsäure, CMP-N-Acetylneuraminsäure und die Cytidinnucleotid mit einem Triäthylammoniumcarbonat-Gradienten eluiert werden (2.5 l Wasser+2.5l 1.0M Triäthylammoniumbicarbonat pH=8.0) Fraktionsvolumen=10ml. Das Elutionsdiagramm (vergl. spätere Abb. 19 und 20) entsprach dem von Kean und Roseman (80) : die nicht umgesetzte N-Acetylneuraminsäure wurde bei einer Konzentration von 0.1M bis 0.15M Triäthylammoniumbicarbonat und die CMP-N-Acetylneuraminsäure bei 0.2M bis 0.45M eluiert. Die Fraktionen wurden gesammelt, gefriergetrocknet, dann in wenig Wasser aufgenommen und nach Kean und Roseman (158) (s. Exp. Teil 3. a. II) analysiert.

Der erste Peak vom Elutionsdiagramm (zurückgewonnene N-Acetylneuraminsäure) enthielt 39.8mg N- $[1-^{14}\text{C}]$ Acetylneuraminsäure und der zweite Peak (CMP-N-Acetylneuraminsäure) enthielt 76.6mg N- $[1-^{14}\text{C}]$ Acetylneuraminsäure. Ausbeute an CMP-N- $[1-^{14}\text{C}]$ Acetylneuraminsäure: 64%.

Spezifische Radioaktivität der CMP-Verbindung: 0.20 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ NeuNAc. Die CMP-N-Acetylneuraminsäure wurde im Vergleich mit N-Acetylneuraminsäure auf Cellulose-Dünnschicht chromatographiert. Die Tabelle zeigt die R_F-Werte in

zwei Fließmittelsystemen: A) 95% Äthanol:1.0M Tris-HCl-Puffer (pH=7.5)=65:35, B) 95% Äthanol:1.0M Ammoniumacetat (pH=7.3)=7:3.

Die radioaktiven Peaks stimmen mit der Färbung nach Entwicklung (mit Bialreagenz) überein (vergl. Abb. 9).

TABELLE 4

	System A	System B
NeuNAc	0.63	0.66
CMP-NeuNAc	0.33-0.45	0.27

Tabelle 4: R_F -Werte von N-Acetylneuraminsäure und deren CMP-Glykosid.

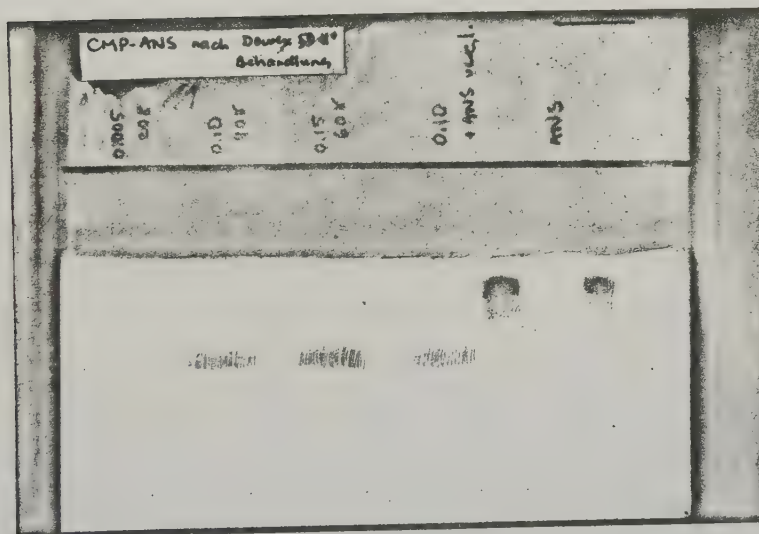


Abb. 9: CMP-NeuNAc und NeuNAc im System A chromatographiert

2. ENZYME

a) Anreicherung der CMP-N-Acetylneuraminat Synthase.

Die CMP-N-Acetylneuraminsäure-Synthase wurde nach Kean und Roseman (158) angereichert.

400 g eingefrorene Rindersubmaxillarisdrüsen wurden fein geschnitten und mit 800ml 0.1M Kaliumphosphatpuffer pH=7.6 1 Std. bei 0°C gerührt. Anschließend wurde die Suspension 1 Std. bei 0°C und 35.000g zentrifugiert und der Überstand durch Glaswolle filtriert. Der Überstand wurde 4x 4 Std. gegen 4l 0.01M Tris-Puffer pH=7.6 dialysiert.

Dieser Rohextrakt kann, wie Kean und Roseman beschreiben, lange Zeit in eingefrorenem Zustand ohne wesentlichen Aktivitätsverlust aufbewahrt werden.

Die Hälfte des Rohextraktes wurde zur späteren Verwendung eingefroren und die andere Hälfte auf eine DEAE-Cellulose-Säule ($\phi=8\text{cm}$, $h=14\text{cm}$, Cellulose nach Kean und Roseman (2) vorbereitet) aufgetragen. Die Säule wurde mit 0.01M Tris-Puffer pH=7.6, 10^{-4}M 2-Mercaptoäthanol enthaltend, äquilibriert. Nachdem das Enzym aufgetragen worden war, wurde die Säule mit 2l des gleichen Puffers gewaschen und dann das Enzym mit 4.5l 0.075M KCl im gleichen Puffer eluiert. Bei dieser Elution erhielt man 4.5l Eluat, dessen Protein bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von 90% gefällt wurde. Die Fällung wurde bei 0°C und 20.000g abzentrifugiert und das Sediment in ungefähr 150ml 0.05M Tris-HCl Puffer pH=7.6, 0.01M KCl u. 10^{-4}M Mercaptoäthanol enthaltend, aufgenommen. Nach Dialyse gegen den gleichen Puffer wurde das Enzym für die Synthese der CMP-N-Acetylneuraminsäure gebraucht. Die Enzymaktivität wurde nach Kean und Roseman (158) bestimmt.

Die folgende Tabelle zeigt, daß das Enzym bei der DEAE-Cellulose-Passage etwa 4fach angereichert wurde. Bei der Konzentrierung des Enzymproteins durch Fällung mit Ammoniumsulfat trat eine Verminderung der Enzymaktivität auf.

TABELLE 3

	E/ml	mg Prot/ml	Spez. Akt. E/mg Prot.
Rohextrakt	2.4	7.5	0.32
DEAE-Cell.-Säule Eluat	0.059	0.045	1.3
Enzymlösung nach $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.1	1.15	0.95
Fällung und Dialyse			

b. Versuche zur Präparation der Acetyl-CoA:

N-Acetylneuraminat-7-oder - 8-O-acetyltransferase

I. Membrangebundenes Enzym

Kurz nach dem Tode entnommene Submaxillarisdrüsen vom Rind wurden von Fett- und Bindegewebe befreit und eingefroren. Die eingefrorenen Drüsen wurden mit der Rasierklinge in 0.5 bis 1mm dicke Schnitte zerlegt und nach folgendem Schema von Schauer und Wember (94) aufgearbeitet.

Rindersubmaxillarisdrüsen

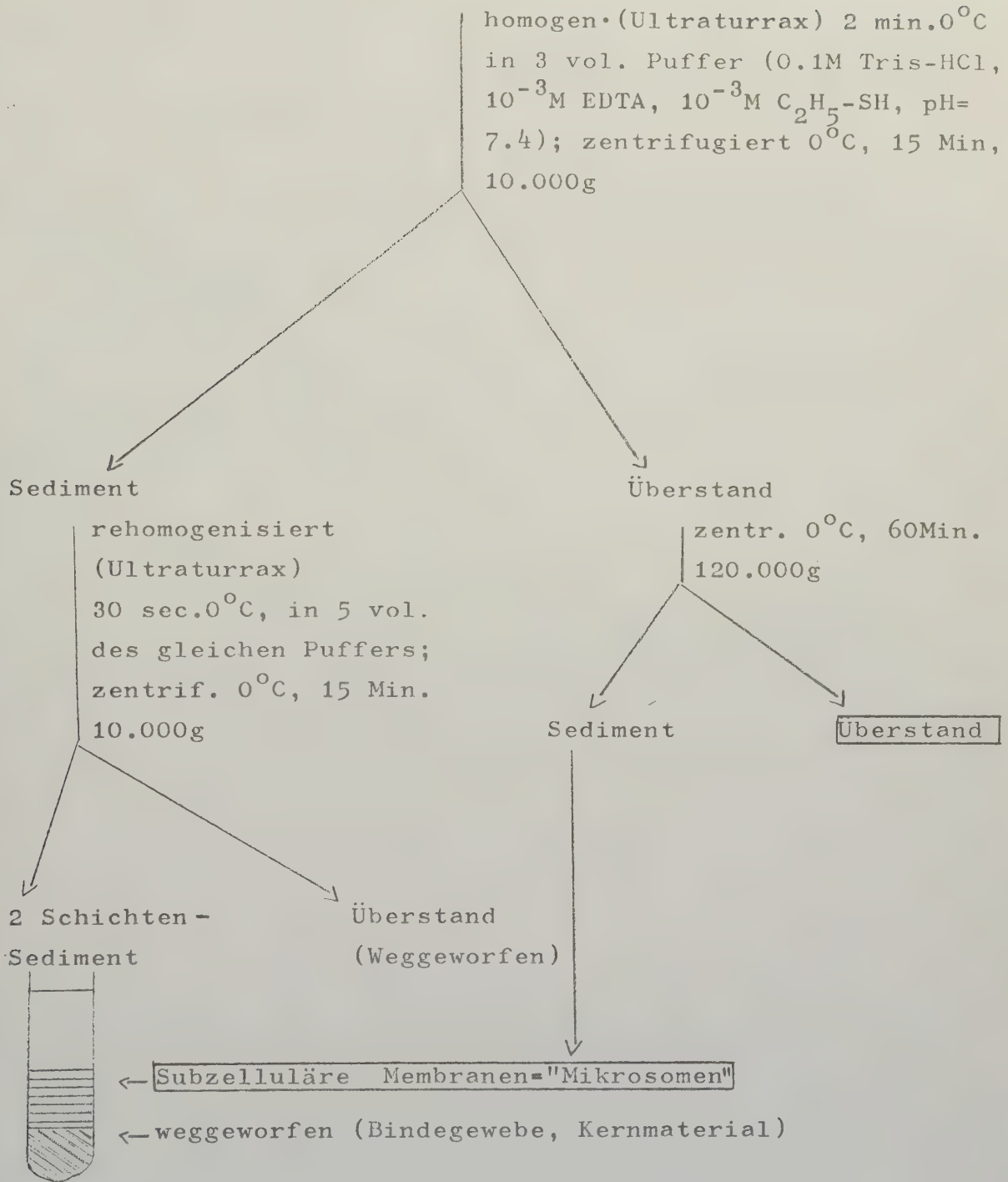


Abb. 10: Schema für die Präparation der Subzellulären Membranen ("Mikrosomen") und Cytosol (Überstand 120.000g)

Die Enzymaktivität wurde im 120.000g Überstand (s. Exp. Teil 3, i. II) und in den subzellulären Membranen (s. Exp. Teil 3, i. I) getestet. Das Enzym blieb größtenteils an den auf diese Weise gewonnenen subzellulären Membranen gebunden.

II. Gelöstes Enzym

In partikelfreien Homogenaten der Submaxillarisdrüsen vom Rind lassen sich sehr schwankende und meist nur geringe Enzymaktivitäten nachweisen, die die Durchführung einer sicheren Enzymkinetik nicht gestatten. Da die Transacetylase überwiegend an die subzellulären Membranen gebunden zu sein scheint, wurden einige Versuche gemacht, um das Enzym aus diesen Membranen abzulösen.

- α) Behandlung mit Triton X-100: Mit der Rasierklinge erhaltene 0.5-1.0mm dicke Submaxillarisdrüsenschnitte wurden in Tris-HCl Puffer (0.1M, 10^{-3} M C_2H_5-SH , pH=7.4), der 0.1% Triton X-100 enthielt, homogenisiert. Das Homogenat wurde über Nacht bei 0°C gerührt und bei 120.000g zentrifugiert. Im Überstand konnte keine Enzymaktivität gefunden werden.
- β) Ultraschallbehandlung: Rohes Homogenat wurde 60 Sekunden mit Ultraschall behandelt; keine Aktivität wurde im 120.000 g Überstand gefunden.
- γ) Wiederholtes Einfrieren und Auftauen: Drüsenschnitte wurden mit dem oben beschriebenen Tris-HCl-Puffer zur Entfernung des Mucins gewaschen. Die gewaschenen Schnitte wurden 5 x eingefroren und aufgetaut und anschließend homogenisiert und bei 120.000g zentrifugiert. Hier wurden je nach Präparation stark wechselnde, meist jedoch nur geringe Enzymaktivitäten im 120.000g Überstand gefunden, die sich aber von den Aktivitäten in partikelfreiem Homogenat von Drüsen ohne vor-

gehendes Einfrieren und Auftauen nicht wesentlich unterschieden. Die nach dem Schema (Abb. 10) präparierten subzellulären Membranen -"Mikrosomen"- gaben auch nach dem Einfrieren und Auftauen einen Pufferextrakt, in dem ebenfalls nur geringe Enzymaktivitäten festzustellen waren.

- 8) Ammoniumsulfatfällung im Homogenat und im Mikrosomenextrakt: Das partikelfreie Homogenat bzw. der mikrosomale Extrakt wurde mit Ammoniumsulfat bis 80%-90% Sättigung versetzt und der Niederschlag in soviel Puffer (0.1M, 10^{-3} M EDTA, 10^{-3} C₂H₅-SH, pH=7.4) aufgenommen wie gerade für die Auflösung des Niederschlags nötig war. Anschließend wurde das Ammoniumsulfat gegen den gleichen Puffer ausdialysiert. Keine Aktivität war in den konzentrierten Proteinlösungen und in den Überständen der Fällungen zu finden.

Da diese ersten, allerdings noch unvollständigen Versuche zur Ablösung des Enzyms erfolglos waren, bzw. Enzymlösungen mit meist sehr geringen Aktivitäten lieferten, entschloß man sich, vor weiteren systematischen Versuchen zur Ablösung die Eigenschaften des partikelgebundenen, konstant an den Mikrosomen nachweisbaren Enzyms zu studieren.

3. ANALYSENMETHODEN

- a) Bestimmung der N-Acetyl-, N-Glykolyl- und N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure und ihrer entsprechenden CMP-Verbindungen.

I: Orcinol/Fe³⁺-Test oder Bialtest (59)

Nach dieser Methode wird die Lösung, die Acylneuraminsäurederivate enthält, mit dem gleichen Volumen von Bial Reagenz (0.1g Orcin, 40.7ml konz. HCl., 1ml 1% FeCl₃-Lösung, mit Wasser ad 50ml) versetzt und 15 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen im Eisbad wird der gebildete Farbstoff mit Amylalkohol extrahiert und bei 546nm photometrisch bestimmt.

In einigen Stufen der Synthesen und der Substanzisolierungen wurden die Acylneuraminsäuren nach Bial bestimmt. Auch die Dünnschichtchromatogramme wurden mit Bial-Reagenz entwickelt. (Die Platten mit Bial-Reagenz besprüht, zugedeckt und 15-20 Minuten bei 120°C erhitzt).

II. Perjodsäure/Thiobarbitursäure Test (TBA Test)

Die Acylneuraminsäuren und ihre CMP-Verbindungen wurden nach einer Modifizierung (158) der Perjodsäure-Thiobarbitursäure-Methode (159) bestimmt. Danach werden die Substanzen mit Perjodsäure reagieren gelassen, wobei sich 3-Formylbrenztraubensäure bildet. Der Überschuß an Perjodsäure wird mit Arsenit zerstört, und die 3-Formylbrenztraubensäure bildet mit Thiobarbitursäure einen roten Farbstoff, der in Cyclohexanon extrahiert und bei 549 nm photometrisch bestimmt wird.

Um zwischen Acylneuraminsäure und CMP-Acylneuraminsäure zu unterscheiden, wird die Lösung, die beide Verbindungen enthält, vorher mit NaBH_4 behandelt. NaBH_4 reduziert nur die glykosidische Ketogruppe der freien Acylneuraminsäure, nicht aber die der glykosidisch gebundenen Acylneuraminsäure. Nach Zersetzung des NaBH_4 -Überschusses mit Aceton wird die erhalten gebliebene Acylneuraminsäure-Komponente des von NaBH_4 nicht angegriffenen CMP-Glykosides wie oben beschrieben mit der modifizierten Thiobarbitursäure-Methode bestimmt (158). Durch Differenzbestimmungen - mit und ohne NaBH_4 -Reduktion - kann man das Verhältnis der Mengen von freier Acylneuraminsäure und von CMP-Acylneuraminsäure in einer Mischung ermitteln.

Die N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure des Rindes (Mischung von 7-O- und 8-O-Acetylderivaten) gibt beim TBA-Test nur 34% (95) der Farbe der entsprechenden N-Acetylneuraminsäuremenge, was zur Identifizierung dieser Acylneuraminsäuren ausgenutzt werden kann.

b) Dünnschichtchromatographie

Die Acylneuraminsäuren wurden dünnschichtchromatographisch auf Cellulose (MN Cellulosepulver 300, Macherey, Nagel and Co., Düren) identifiziert; Dicke der Celluloseschicht: 0.5mm; Raumtemperatur.

I. für Acylneuraminsäuren

n-Butanol: n-Propanol: 0.1N HCl = 1:2:1

n-Butanol: Eisessig:Wasser = 4:1:5

n-Butanol: Pyridin:Wasser = 6:4:3

II. für die CMP-Verbindungen

95% Äthanol:1.0M Tris-HCl Puffer pH=7.5 = 65:35

95% Äthanol:1.0M Ammoniumacetat pH=7.3 = 7:3

Färbung s. Kap. 3, a. I

III. für Acetylhydroxamat

n-Propanol:10% wäss. Ammoniumcarbonat:5N wäss. Ammoniak = 6:2:1

Färbung s. Kap.3, c.

c) Bestimmung von O-Acetylgruppen nach Hestrin (160)

Bei dieser Methode werden die Lösungen, die N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure enthalten, mit alkalischer Hydroxylaminlösung 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Auf das gebildete Acetylhydroxamat läßt man nach Ansäuern der Lösung Fe^{3+} einwirken. Der gebildete weinrote Farbstoff wird photometrisch bei 520nm bestimmt.

Die gleiche Reaktion kann auf einer Dünnschichtplatte durchgeführt werden, um die O-Acetylderivate der N-Acetylneuraminsäure sichtbar zu machen: Die Dünnschichtplatte wird mit alkalischer Hydroxylaminlösung leicht besprüht 10 Min. stehengelassen, trocken geföhnt, mit HClO_4 -Lösung besprüht, nochmals trocken geföhnt und anschließend mit Fe^{3+} -Lösung besprüht.

d) Umwandlung der O-Acetylgruppen der N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure in Acetylhydroxamat.

Die N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure enthaltenden Banden wurden aus der Cellulose-Dünnschichtplatte ausgekratzt und mit Wasser eluiert. Nach schonender Einengung des Eluates zur Trockene am Rotationsverdampfer bei 35°C wurde die zurückgebliebene Substanz mit 1.5 ml alkalischer Hydroxylaminlösung versetzt (1ml 1N KOH in Methanol + 0.5 ml 1N $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ in Methanol; ausgefallenes KCl wird abzentrifugiert) und 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde diese Lösung eingeengt und auf Cellulose-Dünnschicht chromatographiert (Fließmittel:n-Propanol:10% wäss. Ammoniumcarbonat:5N wäss. Ammonium = 6:2:1). Die Entwicklung erfolgte durch Besprühung der Platte mit einer wässrigen 10%igen FeCl_3 -Lösung. Es entwickelten sich weinrote Banden, die radioaktiv waren, wenn Acylneuraminsäuren mit radioaktiven O-Acetylgruppen angeboten worden waren.

e) Umwandlung der N-Acetyl- O-Acetylneuraminsäure in N-Acetylneuraminsäure

Die in den Inkubationsversuchen mit der Transacetylase gewonnene N-Acetyl- O-acetylneuraminsäure wurde durch Ionenaustausch- und Dünnschichtchromatographie gereinigt. (s. Exp. Teil 3. i.I) Die Bande, die N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure enthielt, wurde aus der Dünnschichtplatte ausgekratzt, mit Wasser eluiert und diese N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure enthaltende Lösung am Rotationsverdampfer auf ein Volumen von ca. 0.1 ml eingeengt. (Darin waren durchschnittlich 1 bis 2 μMol N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure enthalten). Zu dieser Lösung wurden 0.1 ml einer 0.2M Hydroxylaminhydrochloridlösung gegeben und der pH-Wert mit NaOH auf 8.0 gebracht. Nachdem diese Lösung 1 Std. bei 37°C gestanden hatte, wurde sie auf eine Dowex 50-Säule gegeben (H^+ -Form; 20/50 mesh, $\phi=1\text{cm}$, $h=10\text{cm}$). Die Säule wurde mit 50ml Wasser gewaschen und dieses Eluat am Rotationsverdampfer schonend eingeengt und anschließend neben N-Acetylneuraminsäure als Vergleich chromatographiert.

f) Proteinbestimmung

Die Ermittlung der Proteinkonzentrationen wurde nach der Methode von Lowry (161) durchgeführt. Um die Proteinbestimmung mit den subzellulären Membranen durchführen zu können, wurden diese mit 5N NaOH während 15 Minuten bei 100°C gelöst.

g) Radioaktivitätsmessungen

Sie erfolgten im Flüssigkeitsscintillationszähler (Nuklear Chicago, Mark I) unter Verwendung eines Toluolscintillators mit 2,5-Diphenyl-Oxazol und 1,4-Bis[5-Phenyloxazolyl-(2)-]benzol (91). Der Quencheffekt wurde über die Kanalverhältnismethode unter Zuhilfenahme von Eichlösungen korrigiert. Als Dünnschichtscanner diente das Gerät LB 2721 (Prof. Dr. Berthold, Wildbad) mit Methandurchflußzählrohr.

h) Bestimmung von Acetyl-Coenzym A

AcCoA wurde nach K. Decker (162) mit Oxalacetat mittels Citrat Synthase (Citrat-oxalacetat-lyase, E.C.4.1.3.7.) bestimmt. Oxalacetat wird nicht zugegeben, sondern in einer vorgeschalteten Indikationsreaktion gebildet. Die Bestimmung beruht auf folgenden Reaktionen



Die Gleichgewichtskonstante der ersten Reaktion beträgt 2.3×10^{-5} und die der zweiten 1.2×10^4 .

Daher kann die NADH-Bildung zur Bestimmung des AcCoA benutzt werden.

i) AcetylCoA:N-acetylneuraminat-7-oder - 8-O-acetyltransferase - Test.

I. Reaktion des Enzyms mit dem endogenen Substrat.

Die nach dem Schema (Abb. 10, Seite 36) gewonnenen subzellulären Membranen- "Mikrosomen"-enthalten neben der Transacetylase auch Glykoproteinmoleküle mit endständig gebundenen Acylneuraminsäuren. (Die

Bestimmung der tatsächlich an naszierenden Glykoproteinmolekülen gebundenen Acylneuraminsäuren ist im Augenblick aus Mangel an geeigneten Methoden noch unmöglich, da die Mikrosomen mit Mucin verunreinigt sind). Diese Acylneuraminsäuren bezeichnet man als endogenes Substrat.

Die Abspaltung der O-Acetylgruppen vom endogenen Substrat vor den Inkubationsversuchen ermöglichte einen 2-fach höheren Einbau von ^{14}C -markierten O-Acetylgruppen in diese membran-gebundenen Glykoproteine. Aus diesem Grund wurde die partikuläre Enzympräparation für alle Versuche vorher mit 0.1M Hydroxylamin in Puffer (0.1M Tris-HCl-oder 0.1M Kaliumphosphat, 0.001M EDTA) bei pH=8.0 1 Std. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden die Membranen 20 Minuten bei 0°C und 150.000g zentrifugiert. Der Bodensatz wurde zur Entfernung des Hydroxylamins 3x mit Puffer gewaschen und dann mit dem doppelten Volumen desselben Puffers aufgenommen. (0.1M Kaliumphosphat-Puffer, 0.001M EDTA und 0.001M $\text{C}_2\text{H}_5\text{-SH}$ enthaltend; der pH-Wert betrug 6.9, abgesehen von den Versuchen zur Bestimmung des pH-Optimums, s. Abb. 11)). Mit dieser Mikrosomensuspension wurden die Versuche durchgeführt. Sie enthielt durchschnittlich 4 μMol gebundene Acylneuraminsäuren und 15mg Protein/ml.

Um die Aktivität der Transacetylase zu testen, wurde in Anlehnung an die Arbeit von Schauer (95) gearbeitet.

Die Enzympräparation wurde mit verschiedenen Konzentrationen von $[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{Acetyl-CoA}$ (Mengen und Inkubationsbedingungen sind in den Ergebnissen bei jedem Versuch beschrieben) bei 37°C unter Schütteln verschiedene Zeiten inkubiert. Anschließend wurde der pH-Wert zum Beenden der Enzymreaktion mit Essigsäure auf 3.0 gebracht und die Inkubationsmischung über Nacht bei 0°C gegen 2 x 100 ml Wasser zur Entfernung des überschüssigen Acetyl-CoA dialysiert.

Die an die dialysierten Zellmembranen gebundenen Acylneuraminsäuren wurden mit Neuraminidase während 24 Std. (100 E/ml) unter gleichzeitiger Dialyse gegen 100ml 0.05M Natriumacetatpuffer pH=5.5, 0.001M CaCl_2 enthaltend, bei 37°C abgespalten.

(Der Dialysepuffer wurde das erste Mal nach 4 Std. gewechselt). Die abgespaltenen Acylneuraminsäuren, die sich im Dialysat befanden, wurden an eine Anionenaustauschersäule gebunden (Dowex 2 x 8: 100-200 mesh, Formiat-Form, $\phi=2\text{cm}$; $h=13\text{cm}$) und nach dem Waschen der Säule mit 150ml Wasser mit 150ml Ameisensäure (0.6M) eluiert. Zur Erzielung guter Chromatogramme wurde dieses Eluat noch über eine Kationenaustauschersäule gegeben (Dowex 50 x 4, 50-100 mesh, H^+ -Form, $\phi=2\text{cm}$; $h=8\text{cm}$). Nach den Säulenpassagen wurde das Eluat schonend (32°C) eingeengt, und die Acylneuraminsäuren präparativ durch Dünnschichtchromatographie auf Cellulose getrennt (Plattendicke = 0.5mm, Laufstrecke 12cm, Fließmittel:n-Butanol:n-Propanol:0.1N HCl=1:2:1, Raumtemperatur).

Nach Lokalisation der neugebildeten radioaktiven N-Acetyl-O-acetyl-neuraminsäure mit Hilfe der Radiodünnschichtchromatographie wurden die entsprechenden Banden ausgekratzt und die Substanzen mit Wasser eluiert. Die spezifische Radioaktivität der auf dieser Weise in reiner Form gewonnenen N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure wurde durch quantitative Bestimmung nach der TBA-Methode und Messung der Radioaktivität im Flüssigkeitsscintillationszähler ermittelt (zpm/ μg). Die spezifische Radioaktivität wird als Maß für die umgesetzte Substratmenge genommen. Die Verwendung der gesamten Menge der isolierten, gereinigten, radioaktiven N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure als Maß für die Enzymreaktion ist nicht zu empfehlen, da während der Abspaltung des Produktes durch Neuraminidase sowie während der vielen und langwierigen Reinigungsschnitte wechselnde und schlecht kontrollierbare Verluste an N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure auftreten können, was einen exakten Vergleich der ermittelten Mengen von N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure zwischen den einzelnen Ansätzen unmöglich macht. Der Verlust der gebildeten N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure während der Aufarbeitung ist durch die Labilität vor allem der -O-[1- ^{14}C]Acetyl-gruppen als auch der Neuraminsäure selbst bedingt. Die Messung der spezifischen Radioaktivität hat den Vorteil, daß dieser Fehler ausgeschaltet wird.

II. Reaktion des Enzyms mit löslichen Substraten: N-Acetyl- und N-Glykolylnneuraminsäure sowie CMP-N-Acetylneuraminsäure

Dieser Enzymaktivitäts-Test wurde für den Versuch über die Substratspezifität (s. Exp. Teil 4.a. VI; Bedingungen dabei) und für die Versuche mit dem löslichen Enzym (s. Exp. Teil 2.b. II) angewendet. Für die Versuche mit dem löslichen Enzym wurde das Homogenat mit verschiedenen Konzentrationen von N-[1-¹⁴C] Acetyl-neuraminsäure - durchschnittlich 1.3µMol/ml - und von AcCoA - 0.2 bis 4µMol/ml - bei 37°C unter Schütteln verschiedene Zeiten - 15Min bis 4 Std - inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Mischung, die entweder das lösliche oder das partikelgebundene Enzym enthielt, 12 Std. gegen 3x100ml Wasser dialysiert. Diese Dialysate, die Substrate und Produkte enthielten, wurden durch Ionenaustauscher- und Dünnschichtchromatographie (wie für das abgespaltene endogene Substrat beschrieben; s. Exp. Teil 3 i. I) gereinigt. Die Ansätze mit dem CMP-Glykosid der NeuNAc wurden vor den Säulenpassagen bei 37°C und bei pH=4 1 Std. zur Abspaltung des CMP-Restes inkubiert. Die Ausbeute an N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure wurde durch Planimetrieren der Radioaktivitätspeaks der dünn-schichtchromatographisch getrennten Substanzen N-Acetyl- und N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure- erfaßt.

j) CMP-N-Acetylneuraminat-Synthase Test.

Angereichertes Enzym wurde mit verschiedenen Mengen von Acylneuraminsäuren inkubiert. (Die Inkubationsbedingungen sind bei den Versuchen beschrieben). Am Ende der Reaktion wurden die Inkubationsmischungen schnell eingefroren um die Reaktion zu beenden. Für die Bestimmung wurden die Proben auf 0.5 ml mit Wasser aufgefüllt und mit 0.1ml NaBH₄ (200mg/ml) 30 Minuten bei Raumtemperatur reduziert. Zur Vervollständigung der Reduktion wurde in Abwandlung der Originalvorschrift die doppelte Menge an NaBH₄ und die

zweifache Zeit benutzt. Der Überschuß an NaBH_4 wurde mit 0.2ml Aceton zerstört (15 Minuten) und die CMP-Verbindung anschließend nach der TBA-Methode bestimmt (Exp. Teil 3. a. II.)

4. ERGEBNISSE

a. Eigenschaften der Acetyl-CoA:N-acetyl-neuraminat-7- oder - 8-O-acetyltransferase (E.C.2.3.1.?)

Folgende Beweise wurden erbracht, daß das Produkt der Enzymreaktion N-Acetyl-mono-O-acetylneuraminsäure ist:

- A) Die durch Kochen denaturierte Enzympräparation lieferte keinen radioaktiven, der N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure entsprechenden Peak, im Gegensatz zu den Ansätzen mit aktivem Enzym.
- B) Bei der Dünnschichtchromatographie in 3 verschiedenen Laufmittelsystemen stimmte die Lokalisation der Farbe der N-Acetyl- O-acetylneuraminsäure nach Entwicklung mit Bial's Reagenz mit der Radioaktivität sowie mit der Vergleichssubstanz überein. Außerdem waren die spezifischen Radioaktivitäten der betreffenden Substanz nach Chromatographie im Salzsäure-, Essigsäure-, und Pyridinsystem identisch. Radioaktive Verunreinigungen waren nicht nachweisbar.
- C) Die quantitative Ermittlung der N-Acetyl-O-acetylneuraminsäuren nach der Orcinol/ Fe^{3+} -Methode und die Bestimmung des Estergehaltes der Substanz nach Hestrin ergaben ein molares Verhältnis von 1:1, d.h. die biosynthetisierte Acylneuraminsäure enthielt eine O-Acetylgruppe pro Molekül.

- D) Die Substanz war nach Behandlung mit Hydroxylamin in N-Acetylneuraminsäure rückverwandelbar (Exp. Teil 3, e.)
- E) Die N-Acetyl-O-[1-¹⁴C]acetylneuraminsäure lieferte nach Behandlung mit Hydroxylamin [1-¹⁴C]Acetyl-Hydroxamat (Exp. Teil 3 d). Bei der Dünnschichtchromatographie des Acetylhydroxamats entsprach auch die Lage des Farbflecks nach Entwicklung mit Fe³⁺ dem radioaktiven Peak. Die spezifische Radioaktivität von der N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure und vom Acetylhydroxamat stimmten erwartungsgemäß überein, da in der N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure nur die O-Acetylgruppe radioaktiv markiert war.

Es konnte über die Position der in diesen Experimenten auf die C-9-Kette der Neuraminsäure übertragen O-Acetylgruppen noch kein sicherer Beweis erbracht werden. Da jedoch in Submaxillarisdrüsen des Rindes die O-Acetylgruppen nur in den Positionen 7 und 8 nachgewiesen wurden (20), darf angenommen werden, daß sich bei den hier beschriebenen Inkubationsansätzen entweder das 7-O-Acetyl- oder das 8-O-Acetylderivat der N-Acetylneuraminsäure oder eine Mischung aus beiden Isomeren bildet. Diese Annahme stützt sich auch auf der Tatsache, daß die gebildete radioaktive N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure durch Neuraminidase abspaltbar ist, ganz im Gegensatz zu der N-Acetyl-4-O-acetylneuraminsäure (20). Hinweise auf das Vorkommen der N-Acetyl-9-O-acetylneuraminsäure sind bisher nicht erhalten worden (20).

Eine genaue Positionsbestimmung der O-Acetylgruppen könnte am sichersten durch polarographische Messungen des Perjodsäureverbrauchs der N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure erfolgen (20). Voraussetzung hierzu ist jedoch die enzymatische

Synthese von größeren Mengen der betreffenden N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure in vitro, welche im Gegensatz zu den hier gebildeten Produkten, nicht mit "kalter", schon vor der enzymatischen Reaktion in glykosidischer Bindung an den Mikrosomen vorliegender N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure vermischt ist.

So läßt sich mit diesen Untersuchungen keine Aussage darüber machen, ob es sich bei der Acetyltransferase in intakten Submaxillarisdrüsen vom Rind um ein Enzym handelt, das O-Acetylgruppen sowohl in die Position 7 bzw. 8 incorporieren kann, oder um zwei verschiedene Transferasen.

I. Abhängigkeit der Umsetzungsgeschwindigkeit vom pH-Wert

Das pH-Optimum der Enzymreaktionen liegt im Bereich von pH=7 wie bei den unter den im Folgenden angegebenen Bedingungen durchgeführten Versuchen ermittelt werden konnte (Abb 11):

Inkubationsmischung : 3ml Enzymsuspension und
0.17 μMol $[1-^{14}\text{C}]$ Acetyl-CoA

Inkubationsvolumen: 3.1ml

Inkubationszeit: 10 min

Puffersysteme: von 4.7 bis 6.9 - 0.1M
Phosphat-Puffer; von 7.4 bis
9.4 - 0.1M Tris/HCl-Puffer

Es konnte durch Untersuchungen der Acetyl-CoA-Stabilität (Exp. Teil 3.h.) ausgeschlossen werden,

daß die unterschiedlichen Ausbeuten an N-Acetyl-O-acetyl-neuraminsäure vielleicht durch eine pH-abhängige Zersetzung des AcCoA bedingt ist. Das AcCoA erwies sich bei allen pH-Werten unter den benutzten Bedingungen als stabil.

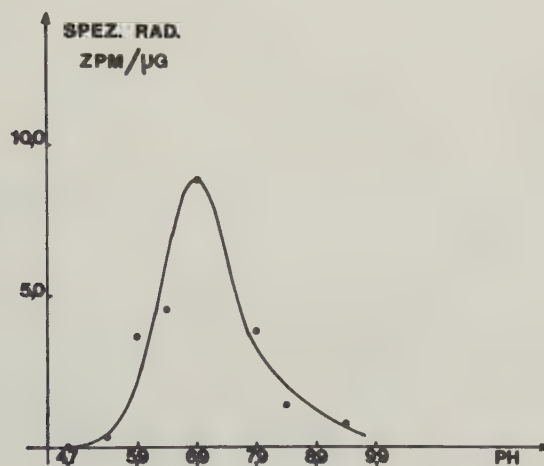


Abb. 11: pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der AcetylCoA:N-Acetylneuraminat-7- oder 8-O-acetyltransferase (E.C.2.3.1.?)
Ordinate: Spezif. Radioaktivität der N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure

II. Der zeitliche Verlauf der Enzymreaktion

Der zeitliche Verlauf der Enzymreaktion wurde bei pH=6.9 studiert. Eine maximale Bildung von N-Acetyl-O- [1-¹⁴C] acetyl-neuraminsäure wurde unter den Versuchsbedingungen nach ca. 30 min beobachtet (Abb. 12).

Die folgenden Versuchsbedingungen wurden verwendet:

Inkubationsmischung: 4 ml Enzymsuspension und
0.26 µMol [1-¹⁴C] Acetyl-CoA

Inkubationsvolumen : 4.1 ml

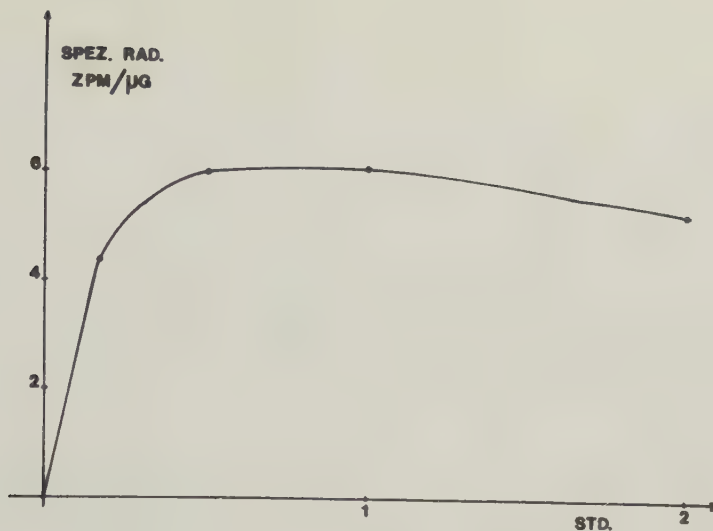


Abb. 12: Transfer von O-Acetylgruppen auf membran-
gebundene N-Acetyl-neuraminsäure in Ab-
hängigkeit von der Zeit.

III. Abhängigkeit von der AcCoA-Konzentration

Um bei konstanter Substrat- und Enzymmenge den Transfer von Acetylgruppen auf die N-Acetyl-neuraminsäure in Abhängigkeit von der AcCoA-Konzentration zu ermitteln, wurden dem Enzym wechselnde Mengen AcCoA angeboten. Die Ansätze waren in folgender Weise zusammengesetzt:

Inkubationsmischung: 2.2ml Enzymsuspension und $[1-^{14}\text{C}]$ -
Acetyl-CoA (0.0034 bis 8.12µMol;
teilweise mit "kaltem" AcCoA verdünnt,
(s. Tab. 5)

Inkubationsvolumen: 2.7 ml

Inkubationszeit: 30 Minuten

TABELLE 5

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μMol "kaltes AcCoA"	-	-	-	-	-	0.876	1.75	2.63	5.26	7.88
μMol [1- ^{14}C] Ac-CoA	0.0034	0.012	0.059	0.12	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
Gesamte μMol AcCoA	0.0034	0.012	0.059	0.12	0.24	1.12	1.99	2.87	5.50	8.12

In den Ansätzen 6 bis 10 wurde die Verdünnung des radioaktiven AcCoA mit "kaltem" AcCoA für die Berechnung der spezifischen Radioaktivität des Produkts berücksichtigt.

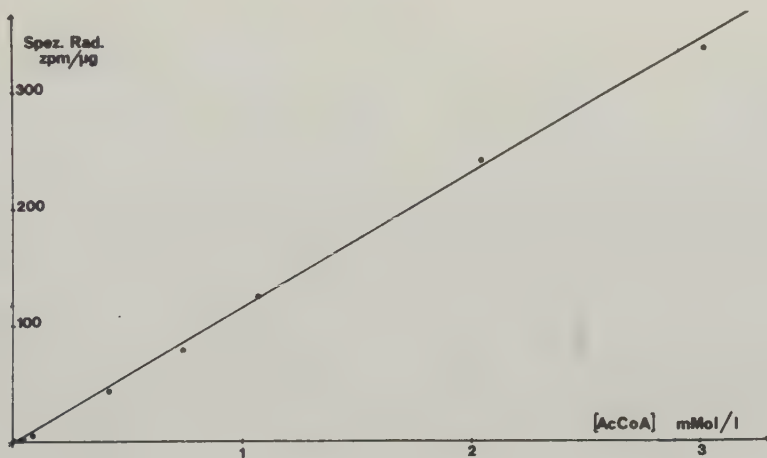


Abb. 13: Bildung der N-Acetyl-O- [1- ^{14}C]acetylneuraminsäure in Abhängigkeit von der AcCoA-Konzentration in 30 Minuten

Die Abb. 13 zeigt, daß unter den beschriebenen Bedingungen die Bildung an N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure der AcCoA-Konzentration proportional war, und AcCoA in den benutzten Konzentrationen das Enzym nicht hemmte.

IV. Ermittlung der Michaelis-Konstante für AcCoA.

Unter den folgenden Bedingungen wurde die Anfangsgeschwindigkeit-

keit der Reaktion in Bezug auf AcCoA studiert (Abb. 14) und damit die entsprechende K_M nach Lineweaver-Burk ermittelt. (Abb. 15)

Für diese Versuche wurden folgende Mischungen gewählt:

Inkubationsmischung: 3.0ml Enzymsuspension und
[1- 14 C] Acetyl-CoA (0.12 bis 8.04
 μ Mol, teilweise mit "kaltem" AcCoA
verdünnt, (s. Tab. 6)

Inkubationsvolumen: 3.63ml

Inkubationszeit: 3 Minuten

TABELLE 6

Ansatz	1	2	3	4	5	6
μ Mol "kaltes" AcCoA	-	-	-	0.54	1.62	7.56
μ Mol [1- 14 C] Acetyl-CoA	0.12	0.24	0.48	0.48	0.48	0.48
Gesamte μ Mol AcCoA	0.12	0.24	0.48	1.02	2.10	8.04

Die Inkubationszeit von 5 Minuten erlaubt das Erfassen der Anfangsgeschwindigkeit (vgl. Zeitkurve, Abb. 12.). Außerdem ist zu diesem Zeitpunkt noch kein Abfall der AcCoA-Konzentration beispielsweise durch Nebenreaktionen zu beobachten. (Nach längeren Inkubationszeiten dagegen, z. B. nach 30 Minuten, ist die AcCoA-Konzentration bereits um 20%-30% zurückgegangen).

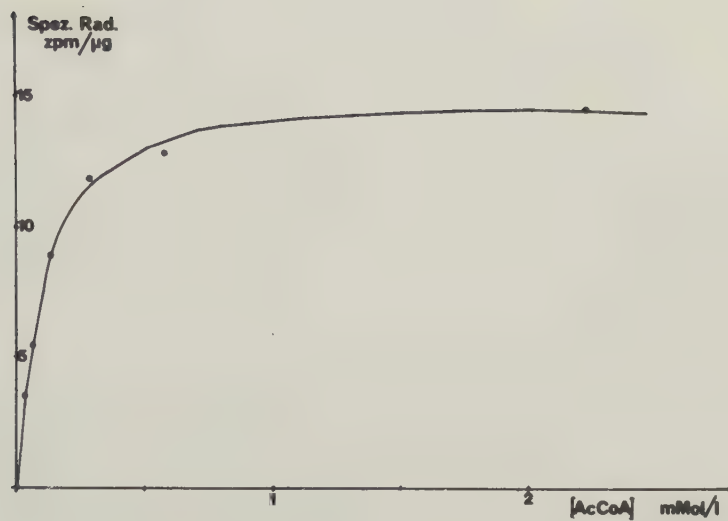


Abb. 14: Abhängigkeit der Geschwindigkeit des Transfers von O-Acetylgruppen auf Microsomen- gebundene N-Acetylneuraminsäure von der Konzentration des AcCoA (5 Minuten Inkubationszeit)

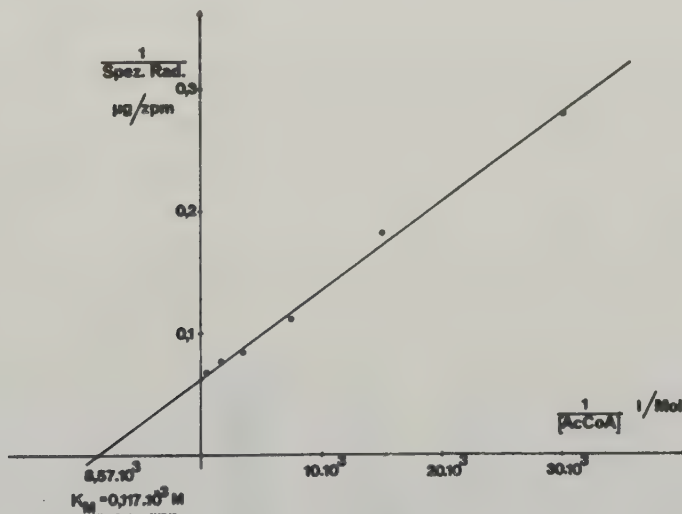


Abb. 15: Lineweaver-Burk-Plot der in Abb. 14 gezeichneten Kurve zur Ermittlung der K_M für AcCoA der Acetyl-CoA:N-Acetylneuraminat-7-oder-8-O-acetyltransferase.

Die Michaelis-Konstante in Bezug auf AcCoA beträgt unter den Versuchsbedingungen $1.17 \times 10^{-4} M$.

V. Hemmung durch CoA

Da Acetyltransferasen bekannt sind, die durch CoA gehemmt werden (z. B. 163), wurde der Einfluß von CoA auch auf die N-Acetylneuraminsäure-O-acetyltransferase unter Verwendung folgender Reaktionsansätze studiert:

Inkubationsmischungen: 3.0. ml Enzymsuspension
0.24 μMol $[1-^{14}\text{C}]$ Acetyl-CoA
(0.066mM) und verschiedene
Konzentrationen CoA (s. Tab. 7)

Inkubationsvolumen: 3.63ml

Inkubationszeit: 5 Minuten

Das Verhältnis von AcCoA: CoA bei diesem Versuch geht aus
Tabelle 7 hervor.

TABELLE 7

Ansatz	1	2	3
$[1-^{14}\text{C}]$ AcCoA (mM)	0.066	0.066	0.066
CoA (mM)	-	0.58	5.8

Die aus den Ansätzen 2 bzw. 3 isolierte N-Acetyl-O-acetyl-
neuraminsäure zeigte eine spezifische Radioaktivität von
3.21 zpm/ μg bzw. 0.59 zpm/ μg und die aus Ansatz 1 (Leer-
wert) eine spezifische Radioaktivität von 5.46 zpm/ μg .

Das heißt, daß CoA bei einer Konzentration von 0.58 mM bzw.
5.8mM die Reaktion unter den Versuchsbedingungen um 40%
bzw. 90% hemmte (Abb. 16).

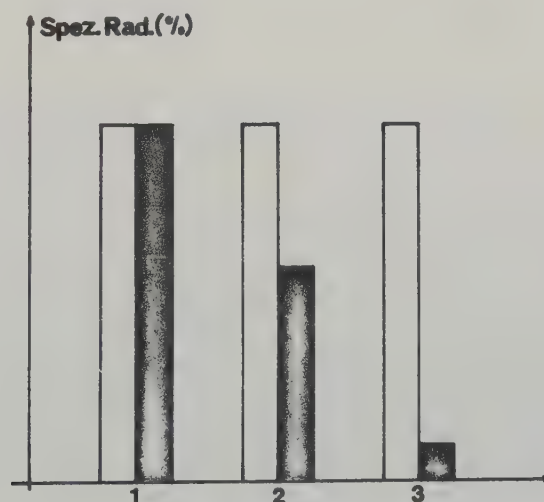


Abb. 16: Einfluß von CoA auf die Geschwindigkeit des Einbaus von
Acetylgruppen in die N-Acetylneuraminsäure der Glyko-
proteine der Rindersubmaxillarisdrüsen in % des
Kontrollansatzes (leere Säulen). 1. ohne CoA; 2.
CoA = 0.58mM; 3. CoA = 5.8mM.

Nach der Feststellung, daß CoA ein Hemmer dieser Reaktion war, wurde der Einfluß von CoA auf die Geschwindigkeit der Reaktion gemessen, indem die CoA-Konzentration konstant gehalten und die AcCoA-Konzentration variiert wurde. Die Inkubationsbedingungen sind im Folgenden beschrieben:

Inkubationsmischung: 3.0ml Enzymsuspension, $[1-^{14}\text{C}]$ Ac-CoA (0.185 bis 5.69µMol, teilweise mit kaltem AcCoA verdünnt, s. Tab. 8) und 1.97µMol CoA (Konzentration: 0.55mM)

Inkubationsvolumen: 3.58ml

Inkubationszeit: 5 Minuten

TABELLE 8

Ansatz	1	2	3	4	5	6
µMol kaltes AcCoA	-	-	-	0.71	2.12	4.95
µMol $[1-^{14}\text{C}]$ -Acetyl-CoA	0.185	0.37	0.74	0.74	0.74	0.74
Gesamte µMol AcCoA	0.185	0.37	0.74	1.45	2.86	5.69
µMol CoA	1.97	1.97	1.97	1.97	1.97	1.97

Bei einer Konzentration von 0.55 mM CoA als Inhibitor wurde für die beschriebenen Versuchsbedingungen die in Abb. 17 gezeichnete Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit von der AcCoA-Konzentration beobachtet.

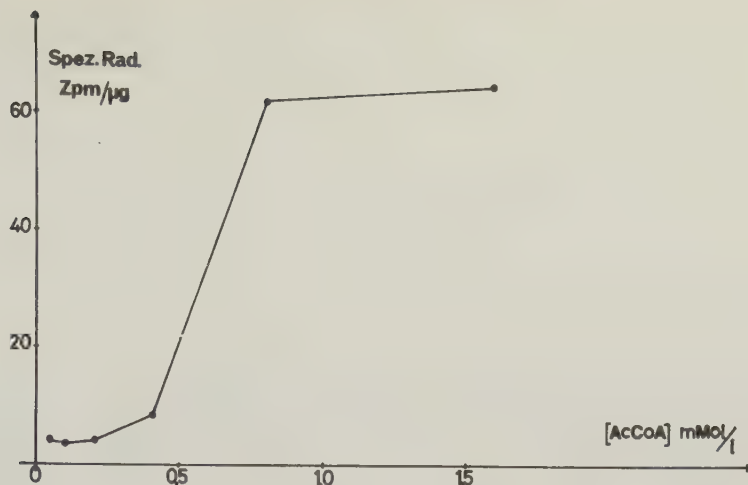


Abb. 17: Geschwindigkeit des Transfers von O-Acetylgruppen in Abhängigkeit von der AcCoA-Konzentration in Anwesenheit von 0.55mM CoA.

Die Punkte stellen Mittelwerte von 2 Versuchen dar, die prinzipiell den gleichen Kurvenverlauf zeigten.

Aus der Abb. 17 kann man sehen, daß die Reaktion stark gehemmt wird solange CoA im Vergleich zu AcCoA im Überschuß in der Lösung enthalten ist. Das wird besonders deutlich, wenn man den schnellen Anstieg der Kurve bei den gleichen AcCoA-Konzentrationen und den gleichen Inkubationszeiten in Abwesenheit von CoA, wie aus Abb. 14 ersichtlich, vergleicht. Sobald aber in dem hier beschriebenen Versuch AcCoA überwiegt, nimmt die Geschwindigkeit des Transfers von Acetylgruppen rasch zu.

VI. Substratspezifität

Für diese Versuche wurden die Mikrosomen vor der Inkubation nicht mit Hydroxylamin behandelt, sondern nach gründlichem Waschen in dem doppelten Volumen Puffer suspendiert und eingesetzt. Folgende Substrate wurden angeboten:

N-[1-¹⁴C] Acetyl-neuraminsäure
CMP-N-[1-¹⁴C] Acetyl-neuraminsäure
N-[1-¹⁴C] Glykolyl-neuraminsäure
Mikrosomen (endogenes Substrat)
als Kontrolle der Enzymaktivität.

Die Inkubationsbedingungen waren wie folgt:

Inkubationsmischung: 3ml Enzymsuspension, Substrate und AcCoA (siehe Tabelle 9).

Inkubationsvolumen: 3.74ml

Inkubationszeit: 5 Minuten

TABELLE 9

	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4
µMol Substrat	1.67	1.67	1.54	1.54	1.59	1.59	?
konz. Substrat (mM)	0.446	0.446	0.412	0.412	0.425	0.425	?
µMol "kaltes" AcCoA	-	3.64	-	3.64	-	3.64	3.28
µMol [1- ¹⁴ C] Ac-CoA	-	-	-	-	-	-	0.52
Konz. AcCoA (mM)	-	0.973	-	0.973	-	0.973	1.00

Tabelle 9: Bezeichnung der Substrate: 1 NeuNAc, 2 CMP- NeuNAc, 3 NeuNGl, 4 endogenes Substrat. a: Leerwerte; b: Ansätze mit AcCoA.

Für die Versuche wurden kurze Inkubationszeiten gewählt, um die Anfangsgeschwindigkeit der Enzymreaktion mit den verschiedenen Substraten zu erfassen. Auf diese Weise ist ein ungefährender Vergleich der Geschwindigkeit des Transfers von O-Acetyl-gruppen auf die verschiedenen Substrate möglich. Aus demselben Grund wurden in allen Ansätzen (mit Ausnahme des endogenen Substrates - s. Diskussion) in etwa gleiche Substrat- und Cosubstratkonzentrationen angeboten.

Bei diesen Versuchen wurden O-Acetylgruppen nur auf das endogene Substrat (durchschnittlich 14.7zpm/µg mikrosomen-gebundene N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure) sowie auf die freie N-Acetylneuraminsäure (durchschnittlich 1.2% Ausbeute an N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure während 5 Minuten Inkubation), aber nicht auf CMP-N-Acetyl-oder N-Glykolylnuraminsäure übertragen.

b. Untersuchungen über die Substratspezifität
der CMP-N-Acetylneuraminat Synthase

I. Beständigkeit der N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuramin-
säure unter den Inkubationsbedingungen

Vor den Versuchen mit der CMP-N-Acetyl-neuraminat-Synthase aus Submaxillarisdrüsen des Rindes wurde die Stabilität der N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure bei pH=8.3 getestet. Das pH=Optimum des Enzyms liegt oberhalb von 8.8 (80), ein Wert, bei dem die O-Acetylgruppen der N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure langsam abhydrolysiert werden. Der pH-Wert von 8.3 hat sich jedoch als günstig erwiesen, da bei diesem pH das Enzym praktisch mit der gleichen Geschwindigkeit arbeitet wie beim in der Literatur angegebenen pH-Optimum, und die Hydrolyse der O-Acetylgruppen nach 2 Std. Inkubation 10% nicht überschreitet, wie Abb. 18 zeigt.

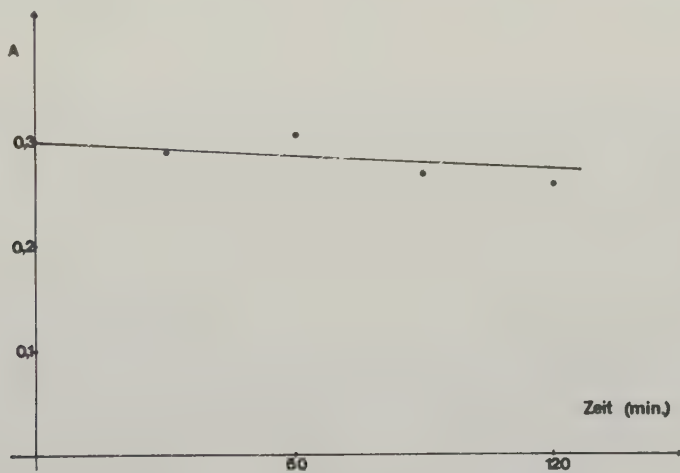


Abb. 18: Beständigkeit der N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure bei pH=8.3. Ordinate: Ext.(520nm) im Hestrin-Test.

Die Inkubationsmischungen enthielten in 0.125ml : 1.0 μ Mol N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure, 0.025 E. Enzym, 0.05ml Puffer (1.0M Tris/HCl, 0.1M Mg^{++} , pH=8.3). Der Leerwert war wie die Proben, aber ohne N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure zusammengestellt. Die Mischungen wurden während der angegebenen Zeiten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Einfrieren der Proben beendet. Nachdem das Protein durch Zugabe von 0.125ml Wasser und 0.125ml 10% TCA-0.5% PTA ausgefällt und durch Zentrifugation entfernt worden war, wurde der Estergehalt nach Hestrin im Überstand bestimmt.

II. Reaktion verschiedener Acylneuraminsäuren mit CTP.

N-Acetyl- und N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure wurden mit dem 3-fach gereinigten Enzym in Anlehnung an Kean und Roseman (158) inkubiert. Die eingesetzten Substanzmengen sind in Tab. 10 aufgeführt:

TABELLE 10

	NeuNAc- 7(8)OAc	NeuNAc
N-Acylneuramin- säure (μMol)	14.2	12.1
CTP (μMol)	18.2	18.2
Puffer(ml)	1.25	1.25
Enzym(E)	4.5	4.5

Als Puffer wurde 1.0M Tris-HCl mit 0.1M Mg^{++} , pH=8.3, benutzt. Die Reaktionsmischungen (Gesamtvolumen 5.0ml) wurden 2 Std. bei 37°C inkubiert, und die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.5ml 1.7M EDTA-Lösung beendet. Nicht umgesetzte Substrate und Produkte wurden, wie bei der Synthese von CMP-N- $[1-^{14}C]$ Acetyl-neuraminsäure beschrieben (Exp. Teil 1.b.IV), durch Gradientenelution vom Anionenaustauscherharz getrennt (Abb. 19 und 20). (Säule : Dowex 1x8, HCO_3^- -Form, 200/400mesh, $\phi=2.2cm$, $h=12cm$, Gradient:200ml Wasser + 200ml 1M Tri-äthylammoniumbicarbonat, pH=8.0). Die Fraktionen wurden nach der TBA-Methode ohne $NaBH_4$ -Reduktion auf ihren Gehalt an Acylneuraminsäuren und durch Lichtabsorption bei 272nm auf ihren Nukleotidgehalt analysiert. Die Ausbeuten an gefriergetrockneten CMP-Nukleotiden betrugen 38% für die N-Acetylneuraminsäure und 27% für die N-Acetyl-O-Acetylneuraminsäure.

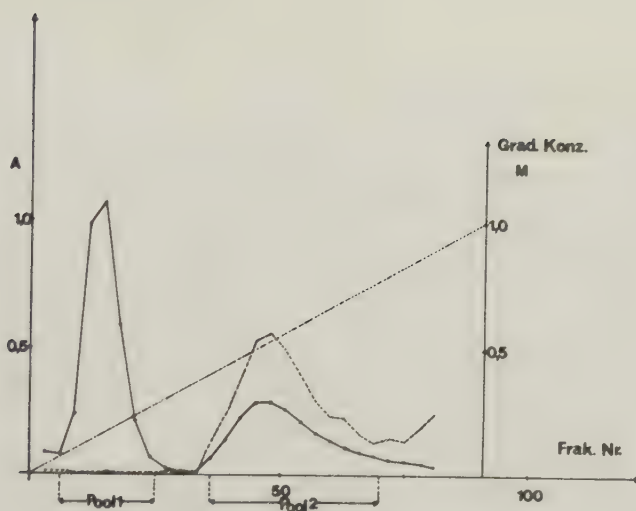


Abb. 19: Synthese der CMP-N-Acetylneuraminsäure durch CMP-N-Acetylneuraminat-Synthase aus Submaxillarisdrüsen des Rindes; — N-Acetylneuraminsäure bestimmt nach dem TBA-Test; --- Nukleotidabsorption bei 272nm; ... Triäthylammoniumbicarbonat-Gradient. Fraktionsvolumen: 4ml. Pool 1: NeuNAc, Pool 2: CMP-NeuNAc.

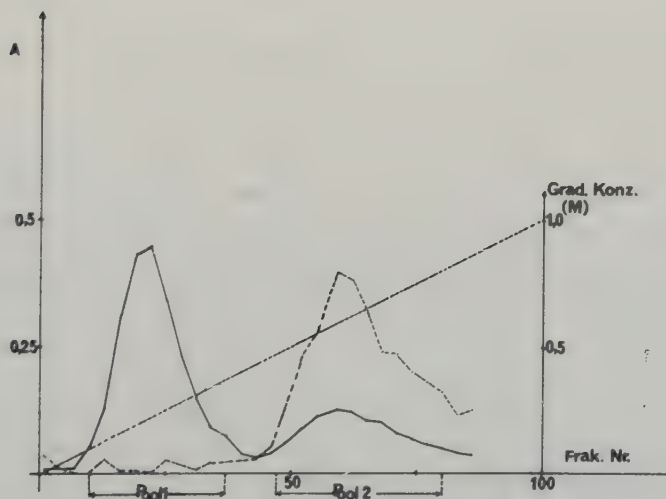


Abb. 20: Synthese der CMP-N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure durch CMP-N-Acetylneuraminat Synthase; — Acylneuraminsäure nach TBA-Test; --- Nukleotidabsorption bei 272nm; Gradient. Fraktionsvolumen: 4ml. Pool 1: NeuNAc OAc, Pool 2: CMP-NeuNAcOAc

Wie aus den Abb. 19 und 20 ersichtlich ist, wurden CMP-N-Acetyl- und CMP-N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure bei der gleichen Konzentration an Triäthylammoniumbicarbonat eluiert.

Die Tabelle 11 zeigt die Menge in μg von Acylneuraminsäuren, die in 0.5ml von jedem Pool (vgl. Abb. 19 u. 20) bestimmt wurden.

TABELLE 11

	NeuNAc		NeuNAcOAc	
	Pool 1	Pool 2	Pool 1	Pool 2
Bestimmung ohne NaBH_4 -Reduktion	21.06	7.56	9.37	4.01
Bestimmung mit NaBH_4 -Reduktion	1.11	6.48	0.83	3.51

Pool 1 enthielt jeweils die freien, nicht umgesetzten Acylneuraminsäuren: sie wurden durch die NaBH_4 -Reduktion zerstört. Die im Pool 2 enthaltenen Substanzen wurden durch die NaBH_4 -Reduktion nicht zerstört: es handelte sich dabei um die CMP-Verbindungen der Acylneuraminsäuren. (Es liegt an der Methode, daß die Werte für Pool 2 mit NaBH_4 -Reduktion 10-15% niedriger liegen als die ohne Reduktion⁴). Durch Dünnschichtchromatographie wurde die Reinheit und Unversehrtheit der CMP-Glykoside in den Pools 2 erwiesen. Die Tabelle 12 zeigt die R_F -Werte für CMP-N-Acetyl- und CMP-N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure im Vergleich mit den R_F -Werten für die entsprechenden Acylneuraminsäuren im Fließsystem 95% Äthanol:1M Ammoniumacetat pH 7.3 = 7:3 auf Cellulose.

TABELLE 12

	R_F
NeuNAc	0.60
CMP-NeuNAc	0.27
NeuNAc-7(8)OAc	0.75
CMP-NeuNAc-7(8)OAc	0.41

R_F -Werte der CMP-NeuNAc und CMP-NeuNAcOAc im Vergleich mit den entsprechenden freien Acylneuraminsäuren.

In folgender Weise wurde nachgewiesen, daß es sich bei der CMP-Acylneuraminsäure im Pool 2 des in Abb. 20 gezeigten Versuches um N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure handelt:

Die Lösung vom Pool 2, die das fragliche CMP-Glykosid enthielt, wurde mit Dowex 50-H⁺ (50/100 mesh) zur Entfernung des Triäthylammoniumbicarbonats der Gradientenlösung auf pH=5 gebracht. Das Harz wurde filtriert und das Filtrat bis ungefähr 2 ml am Rotationsverdampfer eingeengt. Die eingeengte Lösung wurde mit 2N Ameisensäure auf pH=4 gebracht, wobei das enthaltene CMP-Glykosid innerhalb 1 Std. bei 37°C gespalten wurde. Die Lösung wurde anschließend auf eine Anionenaustauschersäule aufgetragen (Dowex 1x8; 200-400mesh; HCO₃⁻-Form, ϕ =2.2cm; h=12cm). Nachdem die Säule mit 100ml Wasser gewaschen worden war, wurde die Acylneuraminsäure mit 100ml KHCO₃ (0.4M) eluiert; dabei wurde nur die Acylneuraminsäure und nicht das Nukleotid herausgelöst. Das Eluat wurde auf pH=5 mit Dowex 50-H⁺ gebracht und über eine Dowex 50H⁺ Säule (50/100 mesh; ϕ =2.2cm; h=12cm) gereinigt. Dieses Eluat wurde vorsichtig eingeengt und auf Cellulosedünnschicht chromatographiert (Celluloseschicht=0.5mm; Fließmittel:n-Butanol:n-Propanol:0.1N HCl=1:2:1). Entwicklung der Chromatogramme mit Bial- und Hestrin-Reagenz zeigten nur N-Acetyl-O-acetylneuraminsäureflecken; d.h. die O-Acetylgruppen der eingesetzten N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure waren während der Enzymreaktion nicht abgespalten worden. Das Reaktionsprodukt war also tatsächlich CMP-N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure, eine Substanz, die auf diese Weise erstmals rein dargestellt wurde (164).

III. Kinetik der CMP-N-Acylneuraminat Synthase mit N-Acetyl- und N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure

Nachdem gezeigt worden war, daß auch N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure Substrat dieser Synthetase ist, wurden noch der zeitliche Verlauf der Enzymreaktion für N-Acetyl- und N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure studiert und die beiden Substrate miteinander verglichen.

α. Der zeitliche Verlauf der Enzymreaktion

Die Inkubationsmischungen enthielten in 0.25ml : 0.96μMol bzw. 0.99μMol N-Acetyl- bzw. N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure; 1.1μMol CTP; 0.05E. Enzym; 0.05ml Puffer (1.0M Tris-HCl, 0.1M Mg⁺⁺, pH=8.3). Die Proben wurden bei 37°C verschiedene Zeiten (s. Abb. 21) inkubiert. Die Leerwerte enthielten alles wie die Proben aber kein CTP (CTP wurde in gleicher Menge unmittelbar vor der colorimetrischen Bestimmung der gebildeten CMP-Verbindung zugegeben). Die Enzymreaktion wurde durch Einfrieren der Proben beendet. Sie wurden dann auf 0.5ml mit Wasser aufgefüllt, und die gebildeten CMP-Verbindungen wurden nach der TBA-Methode bestimmt.

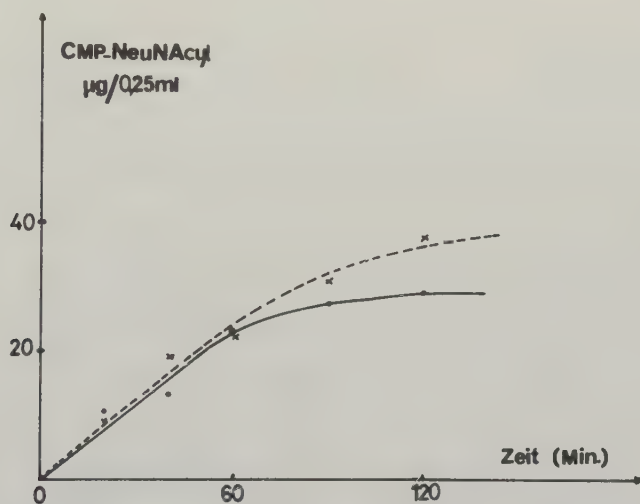


Abb. 21: Zeitlicher Verlauf der Bildung von CMP-N-Acetyl-(—) und CMP-N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure (----) durch die CMP-N-Acetylneuraminat-Synthase

β. Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten in Bezug auf N-Acetyl- bzw. N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure.

Die Inkubationsmischungen enthielten in 0.25ml: 0.066 bis 0.993μMol N-Acetylneuraminsäure bzw. 0.064 bis

0.959 μMol N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure, 0.99 μMol CTP, 0.05 E. Enzym, 0.1ml Puffer (1.0M Tris-HCl, 0.1M Mg^{++} , pH=8.3). Die Inkubationszeit betrug 45 Minuten. Die Leerwerte enthielten kein CTP; es wurde aber vor der Neuraminsäure-Bestimmung die gleiche Menge CTP zugegeben. Die Bestimmungen wurden wie bei der Zeitkurve beschrieben. (Exp. Teil 4. b. III. α .)

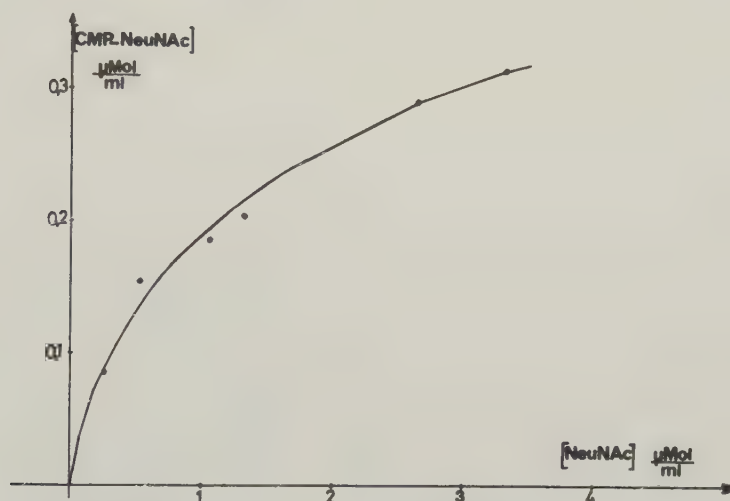


Abb. 22: Geschwindigkeit der Umwandlung von N-Acetylneuraminsäure in ihre entsprechende CMP-Verbindung durch die CMP-N-Acetylneuraminat-Synthase als Funktion der N-Acetylneuraminsäure-Konzentration.

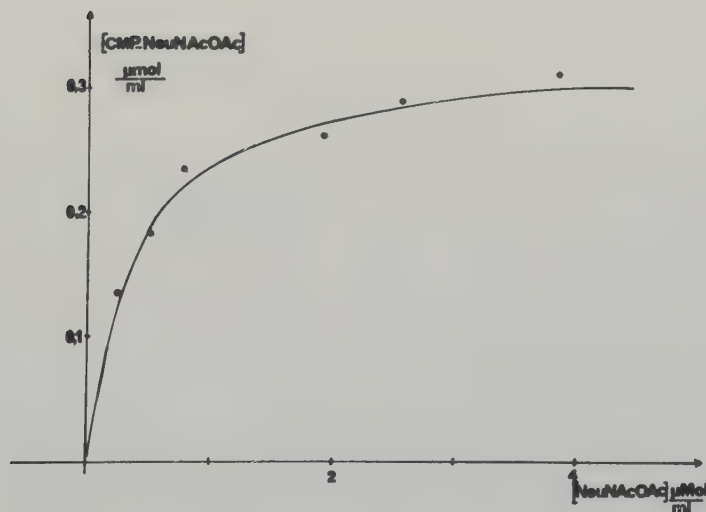


Abb. 23: Geschwindigkeit der Umwandlung von N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure in ihre entsprechende CMP-Verbindung durch die CMP-N-Acetylneuraminat-Synthase als Funktion der N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure-Konzentration.

Aus den in Abb. 22 und 23 gezeigten Verläufen der Bildung der CMP-Glykoside in Abhängigkeit von der Konzentration an Acylneuraminsäuren wurden die Michaelis-Konstanten für die NeuNAc und NeuNAcOAc unter Verwendung der graphischen Darstellung nach Lineweaver und Burk ermittelt (Abb. 24 und 25). Die Michaelis-Konstanten betrugen unter den Versuchsbedingungen 0.87mM für die N-Acetyl- und 0.37mM für die N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure.

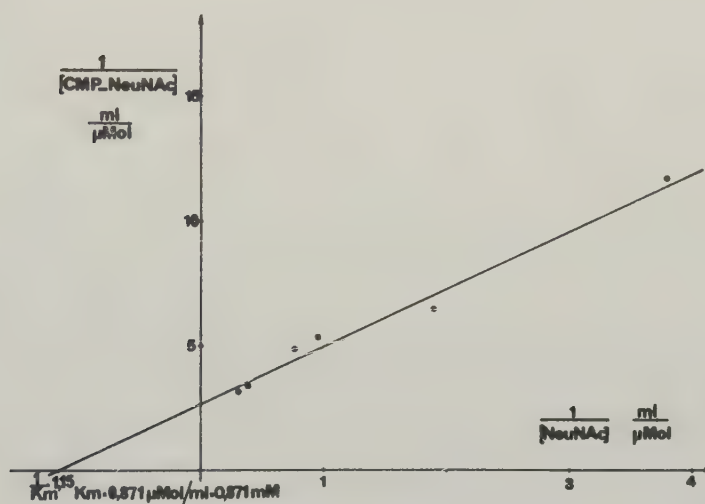


Abb. 24: Lineweaver-Burk-Plot für die in Abb. 22 gezeichnete Kurve (Synthese der CMP-N-Acetylneuraminsäure)

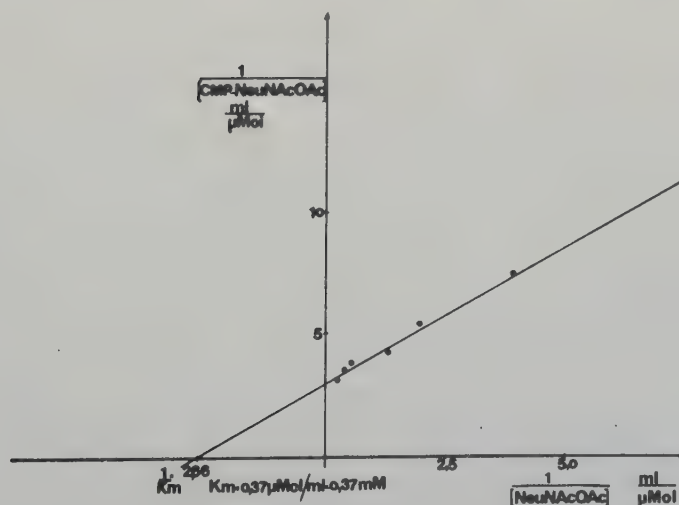


Abb. 25: Lineweaver-Burk-Plot für die in Abb. 23 gezeichnete Kurve (Synthese der CMP-N-Acetyl-7(8)-O-Acetylneuraminsäure).

DISKUSSION

Wie in der Problemstellung (Kap. 6) dargestellt wurde, war das Hauptziel dieser Arbeit die Untersuchung einiger Eigenschaften der Acetyl-CoA:N-Acetylneuraminat-7-oder 8-O-acetyltransferase (E.C.2.3.1.?), die in der Submaxillarisdrüse des Rindes nach folgender Reaktionsgleichung O-Acetylgruppen auf N-Acetylneuraminsäure überträgt:

$\text{N-Acetylneuraminsäure} + \text{AcCoA} \longrightarrow \text{N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure} + \text{CoA}.$

Über dieses Enzym lagen bisher keine genaueren Untersuchungen vor. Seine Anwesenheit in Submaxillarisdrüsen des Rindes wurde postuliert (21), da in diesem Gewebe große Mengen von Acylneuraminsäuren vorkommen, deren Hydroxylgruppen in den Positionen 7 oder 8 mit Essigsäure verestert sind. Das Enzym konnte daraufhin sowohl im partikelfreien Homogenat als auch an subzellulären Membranen von Submaxillarisdrüsen des Rindes nachgewiesen werden (94,95).

In den vorliegenden Untersuchungen galt es nun erstmals Eigenschaften der Enzymreaktion zu studieren und die Kenntnisse über das physiologische bzw. für einen Enzymtest geeignete Substrat zu erweitern.

Da es in einigen vorläufigen und noch sehr unvollständigen Versuchen nicht gelang, das Enzym in befriedigenden Konzentrationen in löslicher Form in die Hand zu bekommen bzw. anzureichern, wurden die Studien mit dem noch an die Mikrosomen gebundenen Enzym ("partikuläres Enzym") durchgeführt. Als Akzeptor für die O-Acetylgruppen diente an wachsende Glykoproteine gebundene N-Acetylneuraminsäure ("endogenes Substrat"); diese Glykoproteine sind, wie das Enzym selbst, an die subcellulären Membranen der Submaxillarisdrüsen gebunden.

Es wurden aus drei Gründen mit diesem System gearbeitet:

- 1) Es handelt sich um ein konstant funktionierendes Enzym, das an den gewaschenen Mikrosomen von frischen oder eingefrorenen Drüsen immer nachzuweisen und in dieser partikel-gebundenen Form stabil war.

- 2) Bei diesem Test konnte als markiertes Substrat käufliches $[1-^{14}\text{C}]$ Acetyl-CoA verwendet werden, das eine hohe spezifische Radioaktivität besaß und auf diese Weise die Feststellung sehr geringer Umsätze ermöglichte.
- 3) Außerdem wurde bei diesem Test mit radioaktivem AcCoA N-Acetyl-O- $[1-^{14}\text{C}]$ acetyl-neuraminsäure gebildet, welche in völlig reiner Form als einziger Peak dünnschichtchromatographisch nachgewiesen werden konnte. (Bei Verwendung des im Homogenat gelösten Enzyms mit "kalter" N-Acetylneuraminsäure und radioaktiv markiertem AcCoA bildeten sich viele radioaktive Stoffwechselprodukte, die sich nur sehr schwer vollständig von der radioaktiven N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure abtrennen liessen).

Zwar konnten die Positionen der in die N-Acetylneuraminsäure in vitro eingebauten O-Acetylgruppen noch nicht direkt bestimmt werden, aber es darf vor allem aufgrund des Verhaltens gegenüber Neuraminidase - wie bei den Ergebnissen im Exp. Teil 4.a, s. 47 schon diskutiert wurde - vermutet werden, daß die Transacetylase des Rindes auch in den hier untersuchten Zellfraktionen O-Acetylgruppen spezifisch in die Positionen 7 oder 8 der Neuraminsäure einbaut, es sich bei dem gebildeten Produkt also um die N-Acetyl-7(8)-O- $[1-^{14}\text{C}]$ acetyl-neuraminsäure handelt.

Es wurden erstmals folgende Eigenschaften des partikulären Enzyms festgestellt: diese Transacetylase arbeitet optimal im Bereich von dem pH-Wert 7. Der Einbau von O-Acetylgruppen ist (wenigstens bis 3mM) der Konzentration an AcCoA proportional, d.h. wenigstens bis zu dieser Konzentration ist das Enzym durch AcCoA nicht hemmbar. Die unter den Versuchsbedingungen bestimmte K_M in Bezug auf AcCoA beträgt $0.117 \times 10^{-3} \text{ M}$.

Nachdem festgestellt worden war, daß CoA ein Hemmer dieser Reaktion ist, wurde versucht, Aufschluß über

die Art der Inhibition zu erhalten und den quantitativen Einfluß von CoA auf die Geschwindigkeit der Reaktion zu studieren. Die Versuche zielten auf eine Bestimmung der Inhibitorkonstante für CoA ab. Man bekam aber die in Abb. 17 gezeichnete Abhängigkeit, die für eine graphische Ermittlung der Inhibitorkonstante nicht geeignet war. Zur sicheren Interpretation dieser Kurve sind weitere kinetische Versuche nötig, z.B. wechselnde Konzentrationen an CoA bei konstanter Menge AcCoA, die Information über die Art der Inhibition liefern sollen. Für solche umfangreiche Versuchsreihen ist die Ausarbeitung eines schnelleren Enzymtests als hier benutzt sowie eine gereinigte, lösliche Enzympräparation unbedingt notwendig. Die Schwierigkeiten, die den hier geschilderten Versuchen zugrunde liegen, werden deutlich, wenn man bedenkt, daß ein Enzymtest 3-4 Tage und das Auswerten einer Versuchsreihe ca. 2 Wochen in Anspruch nimmt.

Die Hemmung des Enzyms durch CoA ist wahrscheinlich auch eine Erklärung dafür, daß die Transfer-Reaktion nach ca. 30 Minuten zum Stillstand kam (Abb. 12), obwohl - wie das Angebot von mehr radioaktivem AcCoA zeigte - noch Akzeptoren für O-Acetylgruppen an den Mikrosomen vorhanden waren. Messungen der Konzentration an AcCoA hatten nämlich erbracht, daß nach 30 Minuten 20-30% des AcCoA zerfallen, bzw. in Nebenreaktionen verbraucht waren: das dabei entstandene CoA dürfte daher als Inhibitor für eine weitere O-Acetylierung wirken.

Die K_M in Bezug auf das endogene Substrat, der Akzeptor für O-Acetylgruppen, wurde aus folgendem Grund nicht bestimmt: Die Mikrosomenpräparation, mit der hier gearbeitet wurde, enthielt noch bis jetzt nicht entfernbare Reste (mehrfaches Waschen war erfolglos) von Mucin aus dem Cytosol, die zwar auch N-Acetylneuraminsäure enthalten, welche aber nach vorläufigen Untersuchungen (95) keinen O-Acetylgruppen-Akzeptor darstellt. Daher war es bis jetzt noch nicht möglich, die wirkliche Menge der am wachsenden Glykoprotein der Mikrosomen gebundenen N-Acetylneuraminsäure zu bestimmen, die das eigentliche endogene, O-Acetylgruppen aufnehmende

Substrat ist. Eines der nächsten Ziele, die sich hier an diese Arbeit anschließen, ist die Reinigung dieser Mikrosomenfraktion von anhaftendem Mucin und auch von Resten anderer Zellfraktionen, ihre Fraktionierung in rauhe und glatte Mikrosomen bzw. Golgiapparate und die Lokalisation der O-Acetyltransferase in diesen Fraktionen, sowie die Bestimmung des Gehalts an gebundener N-Acetylneuraminsäure.

Die Bestimmung der K_M in Bezug auf die freie N-Acetylneuraminsäure konnte wegen methodischer Schwierigkeiten ebenfalls noch nicht durchgeführt werden. Wie im Exp. Teil 4.a.VI. beschrieben wurde, sind die Ausbeuten an N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure aus freier N-Acetylneuraminsäure nur gering. Einmal aus diesem Grunde und zum anderen, weil zur Isolierung des sehr labilen Produktes viele Reinigungsschritte erforderlich sind, ist ein Vergleich der Ausbeuten an N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure in den einzelnen Ansätzen nur mit Vorbehalt möglich. (Die spezifische Radioaktivität des Reaktionsproduktes ist in diesem Falle kein Maß für die Enzymaktivität, da sie der des eingesetzten Substrats entspricht, einerlei ob sich viel oder wenig N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure gebildet hat). Wie jedoch ausführlich bei den Ergebnissen (Exp. Teil 3. i. I., s. 44). diskutiert wurde, ist die Bestimmung der spezifischen Radioaktivität der im Verlaufe der Inkubation gebildeten N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure bei der Untersuchung der anderen Eigenschaften der Transacetylase, wie beispielsweise pH-Optimum, zeitlicher Verlauf der Enzymreaktion, Abhängigkeit von der AcCoA-Konzentration und Inhibition durch CoA, ein sehr verlässliches Maß für die Enzymaktivität, trotz der (in allen Ansätzen gleichmäßigen) Anwesenheit von schon vorgebildeter, nicht radioaktiver N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure. Diese senkt zwar die spezifische Radioaktivität der neugebildeten N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure in allen Ansätzen einer Versuchsreihe, sie tut dies aber in gleichmäßiger Weise und verhindert daher einen genauen Vergleich der spezifischen Radioaktivitäten zwischen den einzelnen Ansätzen nicht.

Zur Ermittlung der Substratspezifität der O-Acetyltransferase des Rindes wurden unter gleichen Bedingungen N-[1- 14 C] Acetyl-neuraminsäure, CMP-N-[1- 14 C] Acetyl-neuraminsäure und N-[1- 14 C] Glykolyl-neuraminsäure mit dem Enzym

und Acetyl-CoA inkubiert. Während sich innerhalb von 5 Min. aus der N-Acetylneuraminsäure durchschnittlich 1.2% und nach einer halben bis zu einer Stunde höchstens nur 4% N- [1-¹⁴C]Acetyl-O-acetylneuraminsäure gebildet hatten, konnte bei den zwei anderen angebotenen Substraten die Bildung von O-acetylierten Derivaten nicht festgestellt werden (s.Exp. Teil 4.a.VI). Das endogene Substrat wird vom Enzym O-acetyliert, worauf sich der hier hauptsächlich benutzte Enzymtest aufbaut. Ein quantitativer Vergleich zwischen endogenem Substrat und freier N-Acetylneuraminsäure ist jedoch schwer zu machen, erstens weil die Konzentration des endogenen Substrats noch nicht bestimmbar ist und zweitens, weil es sich um ein ganz anderes System handelt, nämlich um ein Membran-gebundenes und daher unlösliches, während die N-Acetylneuraminsäure ein lösliches Substrat ist. Beim Membran-gebundenen System dürfte die räumliche Beziehung zwischen Enzym und membrangebundener ("endogener") N-Acetylneuraminsäure auf die Geschwindigkeit der Übertragung von O-Acetylgruppen einen positiven Einfluß haben, wie das bei einem partikulären Multienzymkomplex, der auch hier diskutiert wird (94), allgemein der Fall sein dürfte. Es ist auch noch unbekannt, inwiefern die Peptidkomponente des endogenen Substrats die Geschwindigkeit der Übertragung der O-Acetylgruppen auf die Neuraminsäure beeinflusst.

Die Ergebnisse, die hier über die Substratspezifität erzielt wurden - freie und an Mikrosomen gebundene N-Acetylneuraminsäure werden O-acetyliert - brachten eine Stütze für das auf früheren Versuchen basierende und in der Problemstellung (Kap.6) dargelegte Modell über die Biosynthese der N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure in vivo. Demnach kann in der Zelle sowohl die freie - vor dem Transfer auf das Glykoproteinmolekül - als auch die schon am Glykoprotein der Mikrosomen gebundene N-Acetylneuraminsäure O-acetyliert werden. Sobald ein lösliches Enzympräparat mit hoher spezifischer Aktivität und ein einfacherer Enzymtest zur Verfügung stehen, muß die Substratspezifität der O-Acetyltransferase mittels vergleichender kinetischer Untersuchungen der verschiedenen hier angesprochenen Substrate (freie N-Acetylneuraminsäure bzw. Mikrosomen-ge-

bundene N-Acetylneuraminsäure) genauer ermittelt werden.

Die hier durchgeführten Versuche mit der CMP-N-Acetylneuraminat-Synthase zeigten, daß sich die N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure mit Hilfe dieses Enzyms aus den Rindersubmaxillarisdrüsen in das entsprechende CMP-Glykosid mit Ausbeuten, die denen der N-Acetylneuraminsäure ähneln, umsetzen läßt (Abb. 20). Diese Versuche dienten auch zur weiteren Stütze der Annahme (21,94,95), daß eine O-Acetylierung der N-Acetylneuraminsäure vor ihrem Transfer auf wachsende Glykoproteine der Mikrosomen stattfinden kann. Wird die N-Acetylneuraminsäure noch vor dem Transfer auf das Glykoprotein O-acetyliert, so muß sie mit CMP aktiviert und in dieser Form übertragen werden können.

Vergleichende kinetische Studien der CMP-N-Acetylneuraminat-Synthase mit N-Acetyl- bzw. N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure zeigten eine etwa gleich schnelle Umsetzungsrate (Abb. 21) sowie ähnliche Michaeliskonstanten (Abb. 24 und 25). Daraus ist außer dem oben Gesagten zweierlei zu schließen: entweder haben O-Acetylgruppen in Position 7 und 8 am 9-C Skelett der N-Acetylneuraminsäure keinen wesentlichen Einfluß auf die Enzymreaktion im Vergleich zur unsubstituierten N-Acetylneuraminsäure, oder es liegen im Hinblick auf die unterschiedlichen Acylgruppen der Acylneuraminsäuren verschiedene spezifische Synthasen im Homogenat bzw. in der angereicherten Enzymfraktion vor.

Zur Lösung dieses Problems ist anzustreben, daß das Enzym vollständig gereinigt und dann seine Acylgruppen-Spezifität untersucht wird.

Die Versuche mit der CMP-Neuraminat-Synthase dienten auch dazu, größere Mengen von verschiedenen radioaktiven CMP-Acylneuraminsäuren zu bekommen (164). Dafür war die hier beschriebene, der Literatur entnommene (158) und zeitverbrauchende 3-fache Anreicherung des Enzyms nicht nötig; ebenso gute oder sogar noch bessere Ausbeuten wurden unter Verwendung des leicht gewinnbaren partikelfreien Rohextrakts

von Submaxillarisdrüsen des Rindes erzielt, eine methodische Vereinfachung, die wir bereits veröffentlicht haben (164).

Größere Mengen von CMP-N-[1-¹⁴C]Acetyl-neuraminsäure, deren radioaktive N-Acetylneuraminsäure-Komponente in einem aufwendigen Verfahren aus Neuraminsäure- β -Methylglykosid hergestellt werden mußte, wurden zur Ermittlung der Substratspezifität der in der vorliegenden Arbeit studierten N-Acetylneuraminat-O-Acetyltransferase benötigt.

Die Synthese der CMP-N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäuren erlaubte auch die Untersuchung des enzymatischen Transfers dieser Acylneuraminsäure auf wachsende Glykoproteine der Mikrosomen (165).

ZUSAMMENFASSUNG

- 1.) N-Acetyl-7-O-acetyl- und N-Acetyl-8-O-acetyl-neuraminsäuren werden durch milde Säurehydrolyse von Submaxillarisdrüsen-Glykoproteinen des Rindes abgelöst und durch Säulenpassagen über Ionenaustauscherharze und Cellulose in reiner Form gewonnen. Neuraminsäure- β -Methylglykosid wird durch Methanolyse von Submaxillarisdrüsen-Glykoproteinen mit mehreren Reinigungsschnitten in kristalliner Form erhalten. Das Neuraminsäure- β -Methylglykosid ist Ausgangsmaterial zur Synthese von N-[1- ^{14}C] Acetylneuraminsäure bzw. von CMP-N-[1- ^{14}C] Acetylneuraminsäure.
- 2.) Die in Submaxillarisdrüsen vom Rind vorkommende Acetyl-CoA:N-Acetylneuraminat-7-oder 8-O-acetyltransferase (E.C.2.3.1.?) acetyliert die N-Acetylneuraminsäure an den Hydroxylgruppen der C-Atome 7 oder 8 der N-Acetylneuraminsäure.
- 3.) Das Enzym ist überwiegend an die Mikrosomenfraktion der Submaxillarisdrüsen gebunden und nur in sehr geringen Mengen im partikelfreien Homogenat nachweisbar. Versuche zur Ablösung des Enzyms blieben bis jetzt erfolglos.
- 4.) Der Enzymtest wird mit subcellulären Membranen ("Mikrosomen") und [1- ^{14}C] Acetyl-CoA durchgeführt. An diese Membranen sind das Substrat—N-Acetylneuraminsäure der dort entstehenden Glykoproteinmoleküle ("endogenes" Substrat genannt)—und das Enzym selbst gebunden. Die gebildete N-Acetyl-O-acetylneuraminsäure wird mit Neuraminidase von den Mikrosomen abgelöst, mit Ionenaustauschharzen und durch Dünnschichtchromatographie auf Cellulose gereinigt und auf ihre spezifische Radioaktivität untersucht.
- 5.) Die O-Acetyltransferase arbeitet optimal im Bereiche von dem pH-Wert 7 ; sie besitzt unter den gewählten Versuchsbedingungen eine K_M für AcCoA von $1.17 \times 10^{-4} \text{ M}$, es wird von AcCoA bis zu einer Konzentration von $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ nicht

gehemmt; CoA erweist sich als Inhibitor der Enzymreaktion. Unter den benutzten experimentellen Bedingungen war das Maximum der Transfer-Reaktion nach einer halben Stunde Inkubation bei 37°C schon erreicht.

- 6.) Untersuchungen zur Substratspezifität des Enzyms zeigen, daß sowohl die freie als auch die am Glykoprotein der Mikrosomen gebundene N-Acetylneuraminsäure O-acetyliert werden kann. Das CMP-Glykosid der N-Acetylneuraminsäure wie auch die N-Glykolylnuraminsäure nehmen dagegen keine O-Acetylgruppen auf.
- 7.) Die im Homogenat der Submaxillarisdrüsen vom Rind vorkommende und etwa 3-fach angereicherte CMP-N-Acetylneuraminat Synthase setzt sowohl N-Acetyl- als auch N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure in ihre CMP-Derivate um. Die K_M -Werte für beide Substrate liegen im gleichen Konzentrationsbereich $8.7 \times 10^{-4}M$ für N-Acetylneuraminsäure und $3.7 \times 10^{-4}M$ für N-Acetyl-7(8)-O-acetylneuraminsäure).
- 8.) Aufgrund dieser Resultate wird angenommen, daß die O-Acetylierung der N-Acetylneuraminsäure in der intakten Zelle der Submaxillarisdrüse sowohl vor als auch nach dem Transfer der N-Acetylneuraminsäure auf das an den Mikrosomen wachsende Glykoprotein stattfinden kann. Eine Aussage darüber, welcher Weg in der Zelle häufiger beschritten wird, war noch nicht möglich.

LITERATURVERZEICHNIS

1. G. Blix
Z. Physiol. Chemie 240 (1936) 43
2. E. Klenk
Z. Physiol. Chemie 268 (1941) 50
3. A. Gottschalk
Nature (London) 167 (1951) 845
4. E. Klenk, H. Faillard
Z. Physiol. Chemie 298 (1954) 230
5. E. Klenk, H. Faillard, H. Lempfrid
Z. Physiol. Chemie 301 (1955) 235
6. G. Blix, E. Lindberg, L. Odin, I. Werner
Acta Soc. Med. Upsaliesis 61 (1956) 1
7. E. Klenk, G. Uhlenbruck
Z. Physiol. Chemie 307 (1957) 266
8. G. Blix, E. Lindberg
Acta Chem. Scand. 14 (1960) 1809
9. A. Gottschalk
Nature (London) 176 (1955) 881
10. J.W. Cornforth, M.E. Daines, A. Gottschalk
Proc. Chem. Soc. (London) 1957 , 25
11. J.W. Cornforth, M.E. Firth, A. Gottschalk
Biochem. J. 68 (1958) 57
12. D.G. Comb, S. Roseman
J. Am. Chem. Soc. 80 (1958) 497
13. R. Kuhn, R. Brossmer
Angew. Chem. 74 (1962) 252
14. R. Kuhn, G. Bashang
Chem. Ber. 95 (1962) 2384

15. H. Tuppy, A. Gottschalk
Glycoproteins, their composition, structure and function
(Ed. A. Gottschalk) Elsevier Publ. Co., Amsterdam-London-
New York; 2. Auflage (1972) Vol 5, Part A, s. 404.
16. P. Lutz, W. Lochinger, G. Taigel
Chem. Ber. 101 (1968) 1089
17. F. Wirtz-Peitz
Inaugural-Dissertation, Univ. Bochum, 1969
18. H. J. Schoop, H. Faillard
Z. Physiol. Chem. 348 (1967) 1518
19. G. Blix, E. Lindberg, L. Odin, I. Werner
Nature 175 (1955) 340
20. R. Schauier, H. Faillard
Z. Physiol. Chem. 349 (1968) 961
21. R. Schauier
Z. Physiol. Chem. 351 (1970) 595
22. S. Hakomori, T. Saito
Biochemistry 8 (1969) 5082
23. L. Warren
Biochim. Biophys. Acta 83 (1964) 129
24. K. Hotta, M. Kurokawa
J. Biol. Chem. 245 (1970) 6307
25. W. Gielen
Z. Naturforschung 238 (1968) 1598
26. G. T. Barry, W.F. Goebel
Nature (London) 179 (1957) 206
27. A. Gottschalk
The Chemistry and Biology of Sialic Acids
Cambridge Univ Press. 1960

28. T. Yamakawa, S. Suzuki
J. Biochem. (Tokyo) 38 (1951) 199
29. R. Bourillon, R. Got
Biochim. Biophys. Acta 58 (1962) 63
30. E. Mårtensson, A. Raal, L. Svennerholm
Acta Chem. Scand. 11 (1957) 1604
31. B. Kaufmann, S. Basu, S. Roseman
J. Biol. Chem. 243 (1968) 5804
32. J.A. Cabezas, E. Trigueros, J. Vaázquez-Porto
Rev. Espan. Fisiol. 22 (1966) 15
33. J.A. Cabezas, M.D. Frois, J. Vaázquez-Porto
Rev. Espan. Fisiol. 24 (1968) 133
34. J. Dzulynska, H. Walkowiak, B. Skubiszewski
Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol. 16 (1968) 501
35. J.A. Cabezas, M. Ramos
6. FEBS-MEETING, Madrid 1969, Abstract No. 810
36. H.J. Schoop
persönliche Mitteilung
37. R. Kuhn, R. Brossmer
Angew. Chem. 68 (1956) 211
38. I. Ishizuka, M. Kloppenburg, H. Wiegandt
Biochim. Biophys. Acta 210 (1970) 299
39. T. Osawa, P. Sinay, M. Halford, R.W. Jeanloz
Biochem. 8 (1969) 3369
40. D.J. Tipper, M. Tomoeda, J.L. Strominger
Biochem. 10 (1971) 4683
41. J. R. Dixon, W.K. Roberts, G.T. Mills, J.G. Buchanan,
J. Baddiley
Carb. Res. 8 (1968) 262

42. N. Roy, C.P.J. Glaudemans
Carb. Res. 8 (1968) 214
43. J. W. Sutherland, J. F. Wilkinson
Biochem. J. 110 (1968) 749
44. P. W. Robbins, T. Uchida
J. Biol. Chem. 240 (1965) 375
45. P. W. Robbins, J. M. Keller, A. Wright, R. L. Bernstein
J. Biol. Chem. 240 (1965) 384
46. S. Estrada-Parra, M. Heidelberger
Biochem. 2 (1963) 1288
47. F. Zilliken, P. J. O'Brien
Biochem. Prep. 7 (1960) 1
48. A. Gottschalk, P.E. Lind
Nature 164 (1949) 232
49. L. Odin
Nature 170 (1952) 663
50. E. Klenk, H. Faillard, F. Weygand, H. H. Schöne
Z. Physiol. Chem. 304 (1956) 35
51. L. Svennerholm
Acta Soc. Med. Upsaliensis 61 (1956) 75
52. B. M. Scheintal, F. A. Bettelheim
Carb. Res. 6 (1968) 257.
53. L. Odin
Acta Chem. Scand. 9 (1955) 714
54. F. Zilliken, G.A. Braun, P. György
Arch. Biochem. Biophys. 63 (1956) 394
55. W. Gielen
Z. Physiol. Chem. 348 (1967) 329

56. I. Berggard, L. Odin
Arkiv. Kemi 12 (1958) 581
57. R. Kuhn, R. Brossmer
Chem. Ber. 89 (1956) 2471
58. F. Zilliken, M. C. Glick
Naturwissenschaften 43 (1956) 536
59. P. Böhm, St. Dauber, L. Baumeister
Klin. Wschr. 32 (1954) 289
60. L. Warren, R. S. Blacklow
Biochem. Biophys. Res. Comm. 7 (1962) 433
61. R. S. Blacklow, L. Warren
J. Biol. Chem. 237 (1962) 3520
62. L. Warren, R. S. Blacklow, C. W. Spearing
Ann. N. Y. Acad. Sci. 106 (1963) 191
63. L. Warren, H. Felsenfeld
Biochem. Biophys. Res. Comm. 4 (1961) 232
64. L. Warren, H. Felsenfeld
Biochem. Biophys. Res. Comm. 5 (1961) 185
65. L. Warren, H. Felsenfeld
J. Biol. Chem. 237 (1962) 1421
66. S. Ghosh, S. Roseman
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 47 (1961) 955
67. D. R. Watson, G. W. Jourdian, S. Roseman
J. Biol. Chem. 241 (1966) 5627
68. G. W. Jourdian, A. L. Swanson, D. Watson, S. Roseman
J. Biol. Chem. 239 (1964) PC 2714
69. P.W. Kent, P. Draper
Biochem. J. 87 (1963) 27P

70. P. W. Kent, P. Draper
Biochem. J. 106 (1968) 293
71. R. Joseph, B.K.Bachhwat
J. Neurochem. 11 (1964) 517
72. R. Heimer, K. Mayer
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 42 (1956) 728
73. D. G. Comb, S. Roseman
J. Biol. Chem. 235 (1960) 2529)
74. P. Brunetti, G. W. Jourdian, S. Roseman
J. Biol. Chem. 237 (1962) 2447
75. R. Schauer, M. Wember, F. Wirtz-Peitz, C. Ferreira do Amaral
Z. Physiol. Chem. 352 (1971) 1073
76. H. Faillard, C. Ferreira do Amaral, M. Blohm
Z. Physiol. Chem. 350 (1969) 798
77. D. G. Comb, D. R. Watson, S. Roseman
J. Biol. Chem. 241 (1966) 5637
78. J. Eichberg, Jr., M. L. Karnowsky
J. Biol. Chem. 238 (1963) 3827
79. S. Roseman
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 48 (1962) 437
80. E. L. Kean, S. Roseman
J. Biol. Chem. 241 (1966) 5643
81. L. Warren, R. S. Blacklow
J. Biol. Chem. 237 (1962) 3527
82. L. Warren
Compt. Biochem. Physiol. 10 (1963) 153
83. E. L. Kean
Exptl. Eye Res. 8 (1969) 44

84. D. G. Comb, F. Shimizu, S. Roseman
J. Am. Chem. Soc. 81 (1959) 5513
85. C. E. Cardini, L. F. Leloir
J. Biol. Chem. 225 (1957) 317
86. D. G. Comb, S. Roseman
Biochim. Biophys. Acta 29 (1958) 653
87. L. Glaser
Biochim. Biophys. Acta 41 (1960) 534
88. W. L. Salo, H. G. Fletcher, Jr.
Biochem. 9 (1970) 878
89. W. L. Salo, H. G. Fletcher, Jr.
Biochem. 9 (1970) 882
90. H. J. Schoop, R. Schauer, H. Faillard
Z. Physiol. Chem. 350 (1969) 155
91. R. Schauer, H. J. Schoop, H. Faillard
Z. Physiol. Chem. 349 (1968) 645
92. H. J. Schoop
Habilitationsschrift, Ruhr-Universität Bochum, 1970
93. R. Schauer
Z. Physiol. Chem. 351 (1970) 783
94. R. Schauer, M. Wember
Z. Physiol. Chem. 352 (1971) 1282
95. R. Schauer
Z. Physiol. Chem. 351 (1970) 749
96. T. H. Plummer, Jr., C.A. W. Hirs
J. Biol. Chem. 239 (1964) 2530
97. P. G. Johansen, R. D. Marshall, A. Neuberger
Biochem. J. 78 (1961) 518

98. M. Satake, T. Okuyama, K. Ishihara et al.
Biochem. J. 95 (1959) 749
99. R. J. Clamp, F. H. Putnam
J. Biol. Chem. 239 (1964) 3233
100. R. G. Spiro
New England J. of Med. 281 (1969) 991-1001; 1043-1056
101. E. R. B. Graham, A. Gottschalk
Biochim. Biophys. Acta 38 (1960) 513
102. A. Gottschalk (Ed.)
Glykoproteins; Elsevier Publ. Co., Amsterdam (1966)
103. R. G. Spiro
Ann. Rev. Biochem. 39 (1970) 599
104. S. Roseman
Biochemistry of glycoproteins and related substances,
Proceedings of the 4th International Conference of Cystic
Fibrosis of the Pancreas (Mucoviscidosis), E. Rossi and
E. Stoll, ed. (S. Karger, N. Y. 1968)
105. N. H. Behrens, A. J. Parodi, L. F. Leloir
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68 (1971) 2857
106. A. Gottschalk
Nature 222 (1969) 452
107. F. Melchers, P. M. Knopf
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 32 (1967) 255
108. R. M. Swenson, M. Kern
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 59 (1968) 546
109. E. H. Eylar
J. Theoret. Biol. 10 (1965) 89
110. M. Neutra, C. P. Leblond
Sci. Amer. 220 (1969) 100

111. J. Molnar, G. B. Robinson, R. J. Winzler
J. Biol. Chem. 240 (1965) 1882
112. G. R. Lawford, H. Schachter
J. Biol. Chem. 241 (1966) 5408
113. J. Molnar, D. Sy
Biochem. 6 (1967) 1941
114. E. J. Sarcione
J. Biol. Chem. 239 (1964) 1686
115. G. M. W. Cook, M. T. Laico, E.E. Eylar
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 54 (1965) 247
116. H. Sinohara, H. H. Sky-Peck
Biochim. Biophys. Acta 101 (1965) 90
117. L. Helgeland
Biochim. Biophys. Acta 101, (1965) 106
118. S. Bouchilloux, C. Cheftel
Biochim. Biophys. Res. Comm. 23 (1966) 305
119. A. L. Horwitz, A. Dorfman
J. Cell. Biol. 38 (1968) 358
120. S. Roseman
Chem. and Phys. Lipids 5 (1970) 270
121. A. Gottschalk, M. A. W. Thomas
Biochim. Biophys. Acta 46 (1961) 91
122. J. C. Bousnell, E. F. Hartree, P. A. Briggs
Biochem. J. 117 (1970) 981
123. P. Soupart, R. W. Noyes
J. Reprod. Fertility 8 (1964) 251
124. P. Soupart, T.H. Clewe
Fertility Sterility 16 (1965) 677

125. H. Faillard, W. Pribilla
Proc. 6th Intern. Congr. Biochem. New York, 1964
Klin. Wochenschr. 42 (1964) 686
126. H. Aro, R. Gräsbeck
Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 113 (1970) 65
127. H. Faillard, W. Pribilla, H. E. Posth
Z. Physiol. Chem. 327 (1962) 100
128. C. Velican, N. Marcus, S. Tacorian
Am. J. Digest. Diseases 15 (1970) 413
129. A. G. Morell, G. Gregoriadis, I. H. Schleinberg,
J. Hickman, G. Ashwell
J. Biol. Chem. 246 (1971) 1461
130. W.E. Pricer, G. Ashwell
J. Biol. Chem. 246 (1971) 4825
131. J.J. Woodruff, B. M. Gesner
J. Exptl. Med. 129 (1969) 551
132. A. Lee
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 128 (1968) 891
133. L. Weiss
J. Cell Biol. 26 (1965) 735
134. R. N. Mullinger, G. Manley
Biochim. Biophys. Acta 170 (1968) 282
135. L. Mester
Platelet Aggregation
Table Ronde Roussel (4-5 Mars 1971); Ed. J. Caen (1971)s.131
136. T. Hovig
Thromb. Diath. Haemorrhag. 13 (1965) 84
137. C. Sauter, J. Lindenmann, A Gerber
Europ. J. Cancer, 8 (1972) 451

138. G. F. Springer, N. J. Ansell
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 44 (1958) 182
139. O. Mäkelä, K. Cantell
Ann. Med. Exptl. Biol. Fenniae (Helsinki) 36 (1958) 336
140. E. Klenk, G. Uhlenbruck
Z. Physiol. Chem. 319 (1960) 151
141. C. A. Apffel, J. H. Peters
J. Theor. Biol. 26 (1970) 47
142. G. Uhlenbruck, W. Gielen
Fortschr. Neurol. Psych. Grenz. 38 (1970) 202
143. G. A. Currie, K. D. Bagshawe
Brit. J. Cancer 23 (1969) 141
144. A. Gottschalk (Ed.)
Glycoproteins, their composition, structure and function
(2. Auflage); Elsevier Publ. Co; Amsterdam, London, New York
(1972)
145. K. G. Hirst
Science 94 (1941) 22
146. R. Drzeniek
Z. Mediz. Mikrobiol. Immunol. 155 (1970) 315 u. 156 (1970) 1
147. J. T. Seto, F. S. Chang
J. Virol. 4 (1969) 58
148. J. L. Glick, S. Githens
Nature 208 (1969) 88
149. W. Wesemann, F. Zilliken
Z. Physiol. Chem. 349 (1968) 823
150. W. Brumfitt A. C. Wardlaw
Nature 181 (1958) 1783

151. W. Brumfitt
J. Path. and Bact. 79 (1960) 1
152. D. R. D. Shaw, A. N. Chatterjee
J. of Bacteriology 108 (1971) 584
153. R. Schauer, M. Wember
Z. Physiol. Chem. 351 (1970) 1353
154. R. Schauer
Mündliche Mitteilung
155. H. J. Schoop, H. Faillard
Z. Physiol. Chem. 348 (1967) 1518
156. R. Schauer, F. Wirtz-Peitz, H. Faillard
Z. Physiol. Chem. 351 (1970) 359
157. F. Wirtz-Peitz, R. Schauer, H. Faillard
Z. Physiol. Chem. 350 (1969) 111
158. E. L. Kean, S. Roseman
Methods in Enzymology (Kolowick-Kaplan) VIII (1966) 208
159. L. Warren
J. Biol. Chem. 234 (1959) 1971
160. S. Hestrin
J. Biol. Chem. 180 (1949) 249
161. O. H. Lowry, N.J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall
J. Biol. Chem. 198 (1951) 265
162. K. Decker
Methoden der enzymatischen Analyse (H.U. Bergmeyer),
Band II, (1970) s. 1922
163. Y. Barenholz, S. Gatt
Biochim. Biophys. Res. Comm. 35 (1969) 676

164. R. Schauer, M. Wember, C. Ferreira do Amaral
Z. Physiol. Chem. 353 (1972) 883
165. R. Schauer
Mündliche Mitteilung

Herrn Prof. Dr. Hans Faillard und Herrn
Doz. Dr. Roland Schauer, der mir das Thema
überlassen hat, danke ich sehr für die in
jeder Hinsicht großzügige Förderung bei der
Ausführung dieser Arbeit.

Frau Brigitte Wrage möchte ich für ihre en-
gagierte und außerordentlich geschickte Mit-
arbeit besonders herzlich danken.

LEBENS LAUF

Am 28.10.1940 wurde ich in São Paulo-Brasilien als Tochter von Antonio Pereira do Amaral und seiner Frau Olga Ferreira do Amaral, geb. das Neves, geboren.

Dort besuchte ich von 1947 bis 1951 die Volksschule und von 1952 bis 1958 das Gymnasium.

Im Dezember 1958 legte ich die dem Abitur entsprechenden Prüfungen ab.

1959 wurde ich nach bestandenen Aufnahmeprüfungen in die Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo aufgenommen. Dort studierte ich 4 Jahre Chemie und bekam im Dezember 1962 das Diplom. Im darauffolgenden Jahr studierte ich Pädagogik und begann gleichzeitig in der selben Universität als Stipendiatin der "Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo" bei Prof. Dr. G. Cilento zu arbeiten, wo ich bis Mai 1966 blieb.

Mit einem Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes kam ich im August 1966 nach Deutschland.

Im Oktober 1966 fing ich im Institut für Physiologische Chemie der Ruhr-Universität Bochum bei Herrn Prof. Dr. Hans Faillard zu arbeiten an. Bis zum September 1968 fertigte ich bei ihm meine Diplomarbeit über "Synthese von N-Carbobenzoxy-neuraminsäure- α -Benzylglykosid und Untersuchung der enzymatischen Spezifität der Neuraminidase und der N-Acyl-neuraminsäure-Aldolase in Bezug auf die N-Substitution" an.

Im Februar 1969 begann ich im selben Institut bei Herrn Prof. Dr. H. Faillard unter der Leitung von Herrn Doz. Dr. R. Schauer zunächst als wissenschaftliche Hilfskraft und ab 1.7.1970 als Assistentin m.d.V.b. mit den Untersuchungen zur vorliegenden Dissertation.

Clarice F. do Amaral.

Bochum, den 6.11.1972 (Clarice Ferreira do Amaral)



